

Bochum 1976

**Isolierung und chemische Charakterisierung
von Mucopolysaccharid aus Submaxillarisdrüsen**

Bernd Herfort

1976

ISOLIERUNG UND CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG
VON MUCOPOLYSACCHARID AUS SUBMAXILLARISDRÜSEN

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Chemie
an der Ruhruniversität Bochum

vorgelegt
von
Bernd Herfort
aus
Mörfelden / Kr. Groß - Gerau

Bochum 1976

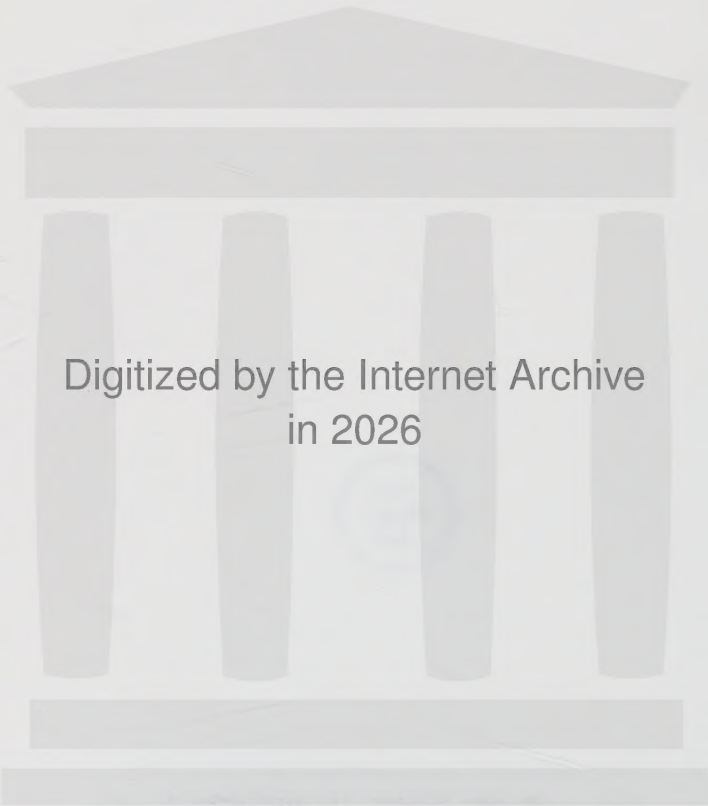


Dissertation eingereicht am 29.März 1976
Tag der mündlichen Prüfung : 6.Juli 1976
Referent : Prof.Dr. Pfeleiderer
Korreferent : Prof.Dr. Fortnagel

INHALT

1.	Einleitung	1
2.	Die Eltern als Vorbild	2
3.	Die Eltern als Helfer	3
4.	Die Eltern als Richter	4
5.	Die Eltern als Berater	5
6.	Die Eltern als Organisator	6
7.	Die Eltern als Motivator	7
8.	Die Eltern als Kritiker	8
9.	Die Eltern als Unterstützer	9
10.	Die Eltern als Beobachter	10
11.	Die Eltern als Teilnehmer	11
12.	Die Eltern als Leiter	12
13.	Die Eltern als Helfer	13
14.	Die Eltern als Richter	14
15.	Die Eltern als Berater	15
16.	Die Eltern als Organisator	16
17.	Die Eltern als Motivator	17
18.	Die Eltern als Kritiker	18
19.	Die Eltern als Unterstützer	19
20.	Die Eltern als Beobachter	20
21.	Die Eltern als Teilnehmer	21
22.	Die Eltern als Leiter	22
23.	Die Eltern als Helfer	23
24.	Die Eltern als Richter	24
25.	Die Eltern als Berater	25
26.	Die Eltern als Organisator	26
27.	Die Eltern als Motivator	27
28.	Die Eltern als Kritiker	28
29.	Die Eltern als Unterstützer	29
30.	Die Eltern als Beobachter	30
31.	Die Eltern als Teilnehmer	31
32.	Die Eltern als Leiter	32
33.	Die Eltern als Helfer	33
34.	Die Eltern als Richter	34
35.	Die Eltern als Berater	35
36.	Die Eltern als Organisator	36
37.	Die Eltern als Motivator	37
38.	Die Eltern als Kritiker	38
39.	Die Eltern als Unterstützer	39
40.	Die Eltern als Beobachter	40
41.	Die Eltern als Teilnehmer	41
42.	Die Eltern als Leiter	42
43.	Die Eltern als Helfer	43
44.	Die Eltern als Richter	44
45.	Die Eltern als Berater	45
46.	Die Eltern als Organisator	46
47.	Die Eltern als Motivator	47
48.	Die Eltern als Kritiker	48
49.	Die Eltern als Unterstützer	49
50.	Die Eltern als Beobachter	50
51.	Die Eltern als Teilnehmer	51
52.	Die Eltern als Leiter	52
53.	Die Eltern als Helfer	53
54.	Die Eltern als Richter	54
55.	Die Eltern als Berater	55
56.	Die Eltern als Organisator	56
57.	Die Eltern als Motivator	57
58.	Die Eltern als Kritiker	58
59.	Die Eltern als Unterstützer	59
60.	Die Eltern als Beobachter	60
61.	Die Eltern als Teilnehmer	61
62.	Die Eltern als Leiter	62
63.	Die Eltern als Helfer	63
64.	Die Eltern als Richter	64
65.	Die Eltern als Berater	65
66.	Die Eltern als Organisator	66
67.	Die Eltern als Motivator	67
68.	Die Eltern als Kritiker	68
69.	Die Eltern als Unterstützer	69
70.	Die Eltern als Beobachter	70
71.	Die Eltern als Teilnehmer	71
72.	Die Eltern als Leiter	72
73.	Die Eltern als Helfer	73
74.	Die Eltern als Richter	74
75.	Die Eltern als Berater	75
76.	Die Eltern als Organisator	76
77.	Die Eltern als Motivator	77
78.	Die Eltern als Kritiker	78
79.	Die Eltern als Unterstützer	79
80.	Die Eltern als Beobachter	80
81.	Die Eltern als Teilnehmer	81
82.	Die Eltern als Leiter	82
83.	Die Eltern als Helfer	83
84.	Die Eltern als Richter	84
85.	Die Eltern als Berater	85
86.	Die Eltern als Organisator	86
87.	Die Eltern als Motivator	87
88.	Die Eltern als Kritiker	88
89.	Die Eltern als Unterstützer	89
90.	Die Eltern als Beobachter	90
91.	Die Eltern als Teilnehmer	91
92.	Die Eltern als Leiter	92
93.	Die Eltern als Helfer	93
94.	Die Eltern als Richter	94
95.	Die Eltern als Berater	95
96.	Die Eltern als Organisator	96
97.	Die Eltern als Motivator	97
98.	Die Eltern als Kritiker	98
99.	Die Eltern als Unterstützer	99
100.	Die Eltern als Beobachter	100

Meinen Eltern in Dankbarkeit



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einführung	S. 1
1.1.	Definition der Stoffklasse	S. 1
1.2.	Physikalisch - chemische Eigenschaften der Glycoproteine	S. 2
1.3.	Biologische Synthese	S. 3
1.4.	Vorkommen und Funktion	S. 4
1.5.	Bedeutung der Zuckeranteile	S. 6
1.6.	Chemie der Glycoproteine	S. 7
1.7.	Die Protein - Kohlenhydrat - Bindung ...	S. 8
1.7.1.	N - glycosidische Bindung	S. 8
1.7.2.	O - glycosidische Bindung	S. 9
1.7.3.	Esterbindung	S. 10
1.8.	Glycoproteine aus Submaxillarisdrüsen ..	S. 10
1.8.1.	Schafsubmaxillarmucin (OSM)	S. 11
1.8.2.	Rindersubmaxillarmucin (BSM)	S. 11
1.8.3.	Schweinesubmaxillarmucin (PSM)	S. 11
1.8.4.	Pferdesubmaxillarmucin (ESM)	S. 12
1.9.	Theorien über die Biosynthese der Mucine.	S. 12
2.	Abgrenzung der Arbeit	S. 14
3.	Experimenteller Teil	S. 15
3.1.	Herkunft des Materials	S. 15
3.2.	Aufarbeitung des Mucins	S. 15

3.3.	Enzymatische Spaltung des Mucins	S.16
3.3.1.	Pronase	S.16
3.3.2.	Ficin	S.17
3.4.	Reinigung der erhaltenen Glycopeptide ...	S.17
3.4.1.	Säulenchromatographie mit Molekularsieben.	S.17
3.4.2.	Ionenaustauschchromatographie	S.21
3.4.3.	Dünnschichtchromatographie	S.21
3.4.4.	Hochspannungselektrophorese	S.21
3.4.5.	Reinheitskriterien	S.31
3.5.	Untersuchung des Kohlenhydratanteils	S.34
3.5.1.	Das Gesamtmucin	S.34
3.5.2.	Untersuchung des Kohlenhydratanteils der Glycopeptide	S.34
3.5.2.1.	Gaschromatographie	S.35
3.6.	Versuche zur Massenspektrometrie	S.44
3.6.1.	Die Methylierung von Zuckern	S.44
3.6.1.1.	Methode nach Purdie	S.44
3.6.1.2.	Methode nach Kuhn	S.44
3.6.1.3.	Methode nach Haworth	S.45
3.6.1.4.	Methode nach Hakamori	S.45
3.6.2.	Solvolyse der methylierten Kohlenhydrate..	S.46
3.6.3.	Identifikation	S.46
3.6.4.	Durchführung	S.47
3.7.	Untersuchung des Peptidanteils	S.52
3.7.1.	Aminosäureanalysator	S.52

3.7.1.1.	Ergebnisse	S.52
3.7.2.	Untersuchungen zur Aminosäuresequenz ..	S.53
3.7.2.1.	Aminopeptidase M	S.53
3.7.2.2.	Carboxypeptidase A	S.53
3.7.2.3.	Endgruppenanalyse	S.54
3.8.	Untersuchung des Kohlenhydrat - Protein- Bindungstyps	S.54
3.8.1.	β - Elimination	S.54
4.	Diskussion	S.55
4.1.	Aufarbeitung des Mucins	S.55
4.2.	Enzymatische Spaltung	S.56
4.4.	Reinheitskriterien	S.57
4.5.	Diskussion der analytischen Methoden ..	S.59
4.6.	Besonderheiten der Aminosäurezusammen- setzung	S.60
4.7.	Überlegungen zur Biosynthese und Evolution der Submaxillarismucine	S.61
4.8.	Struktur der isolierten Glycopeptide ..	S.63
5.	Zusammenfassung der Arbeit	S.66
6.	Literaturliste	S.67

1. Einführung

1.1. Definition der Stoffklasse.

Die Klasse der Glycoproteine gehört zu den ältesten bekannten Stoffen in der Chemie. Die unter der Bezeichnung "mucus" (Schleim) bereits im 18. Jahrhundert bekannten Stoffe wurden von BOSTOCK (1) im Jahre 1805 als verschieden von Eiweiß und Gelatine erkannt. Im Jahre 1865 fand EICHWALD (2), daß diese "Schleimstoffe" Protein und Zucker enthalten. HAMMARSTEN (3) wies nach, daß Kohlenhydrate und Proteine in den Mucinen chemisch gebunden und kein Gemisch sind. Außerdem stellte er als erster fest, daß der Zuckeranteil Stickstoff enthalten kann (4), und daß Mucine sauren Charakter haben können (5). Er unterschied "echte Mucine" aus Schleimdrüsen von z.B. aus Ascites gewonnenen "Mucoiden" (6).

Die in den folgenden Jahrzehnten gewonnenen Forschungsergebnisse brachten dann K. MEYER zu seiner 1938 veröffentlichten Definition der Kohlenhydrat-Protein-Komplexverbindungen, wobei er nur die hexosaminhaltigen Verbindungen berücksichtigte (7):

A) Mucopolysaccharide

1. Verbindungen mit Uronsäure
 - a. sulfatfrei (z.B. Hyaluronsäure)
 - b. sulfanhaltig (z.B. Chondroitinsulfat)
2. Neutrale Mucopolysaccharide von bekannter Zusammensetzung (z.B. Chitin, Blutgruppen-A-substanz).

B) Glycoproteine mit neutralen Mucopolysacchariden unbekannter Zusammensetzung (z.B. Ovalbumin, Serumglobulin)

Diese Definition wurde im Laufe der folgenden Jahre noch mehrmals geändert.

1962 führte A. GOTTSCHALK (8) die noch heute gebräuchliche Definition ein:

Glycoproteine sind konjugierte Proteine, die als prosthetische Gruppe eine oder mehrere Heterosaccharide mit relativ geringer Anzahl an Zuckern enthalten, wobei eine "repeating unit" fehlt. Die Zuckerseitenkette ist kovalent an das Eiweißgerüst gebunden. Im Gegensatz dazu enthalten die Polysaccharid-Protein-Komplexe sich wiederholende Einheiten.

1.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften der Glycoproteine.

Glycoproteine variieren in Molekulargröße und -gestalt. in weitem Bereich. Sie reichen von einem globulären Protein wie Ovalbumin bis zu den starren und stabförmigen Submaxillarisglycoproteinen. Ebenso kann ihre Viskosität variieren.

Glycoproteine unterscheiden sich von einfachen Proteinen hauptsächlich durch drei Eigenschaften (9):

1. Polydispersität.

Eine große Anzahl von Glycoproteinpräparaten enthalten Molekülen mit derselben allgemeinen chemischen Struktur, die aber in Molekulargröße, in der Ladung und in der detaillierten chemischen Ausgestaltung der Zuckerseitenketten unterschiedlich sind.

2. Räumliche Asymetrie.

Man kann Glycoproteine nicht wie Proteine annähert als Kugel oder Späroid betrachten. Sie stellen also kein "Zufallsknäuel" dar.

Es besteht im Gegensatz zu den Proteinen keinerlei Relation zwischen Molekulargewicht und dem von dem Molekül eingenommenen Raumvolumen. Eine Molekulargewichtsbestimmung ist mit Hilfe eines Molekularsiebes praktisch sinnlos, da man nicht wissen kann, ob das Molekül kugel- oder stabförmig

ist, da dies von verschiedenen Faktoren wie Salzkonzentration, pH-Wert und Eigenkonzentration abhängig ist.

3. Eine hohe molekulare Ladungsdichte.

Diese verursacht vor allem die zahlreichen Gestaltsänderungen bei pH-Verschiebung und die starke Pufferkapazität. Damit verbunden ist der hohe Grad der Hydratisierung, der ein viel größeres Volumen im Molekularsieb vortäuscht.

Diese Eigenschaften haben die Erforschung der Glycoproteine bis jetzt sehr erschwert und sind wahrscheinlich mit der Grund, daß unsere Kenntnisse auf diesem Gebiet nicht so umfassend sind, wie in anderen Bereichen der Biochemie.

1.3. Biologische Synthese.

Daß homogene Glycoproteinpräparationen nicht monodispers, sondern polydispers sind, wird verständlich, wenn man den biologischen Syntheseweg betrachtet. Während das Proteingrundgerüst direkt von der DNS abgelesen wird, also genetisch festgelegt ist, werden die Zuckeranteile von Enzymsystemen an die fertige Proteinkette angelagert. Dabei wird ein "Schritt für Schritt"-Mechanismus vermutet (10). Ein Zucker wird nach dem anderen in die wachsende Seitenkette eingebaut.

Die Genauigkeit des Einbaus ist abhängig von der Spezifität und der Aktivität dieser Transglycosidasen. Im Gegensatz zu den einfachen Proteinen können also "Produktionsfehler" auftreten, ohne daß die Originalmatrize selbst beschädigt ist. Man findet folglich immer eine Art Gaußsche "Qualitäts"-Verteilung und hat dementsprechend auch keinen "chemisch reinen" Stoff.

Die Exaktheit der Enzymsysteme hängt vermutlich stark von den Erfordernissen des Organismus ab; bei Blutgruppensubstanzen wird es mehr auf die Genauigkeit ankommen, als beim Speichel.

1.4. Vorkommen und Funktion.

Zucker-Eiweiß-Verbindungen gehören zu den essentiellen Bestandteilen des tierischen und pflanzlichen Lebens. Praktisch jede Zelle stellt Glycoproteine her, die zum Teil in ihr verbleiben und dort Strukturbestandteile der Organellen und der inneren und äußeren Membranen darstellen.

Andere Glycoproteine werden von der Zelle ausgeschieden. Dazu gehören vor allem die Mucine, die Immunglobuline, Hormone (z.B. Gonadotropine) und eine große Anzahl von Enzymen.

Auch die nicht zellulären Bestandteile des Bindegewebes wie Kollagen sind Glycoproteine.

Man kann daraus erkennen, wie weitverbreitet Glycoproteine sind.

Obwohl die Stoffklasse noch lange nicht völlig erforscht ist, kann man bis jetzt einige Hauptfunktionen herauschälen (11, 12, 13):

1. Viele Glycoproteine sind stoffwechselaktiv (z.B. Hormone, Enzyme, Gerinnungsfaktoren) oder bilden einen Bestandteil der humoralen Verteidigung (Immunglobuline, Properdin).
2. Einige schützen Oberflächen gegen mechanische, chemische oder physikalische Beschädigungen (Mucin).
3. Verwandt damit ist ihre Rolle als Gleitmittel (Verdauungstrakt).

DE VRIES et al (14, 15) haben Gefrierpunktserniedrigende Serumglycoproteine arktischer Fische untersucht, die bei Verlust oder Modifizierung der Zucker diese Eigenschaft verlieren.

Die Bedeutung des ABO-Blutgruppensystems für unsere immunologische Reaktion ist hinreichend bekannt.

Es zeigen sich folgende Hauptfunktionen der Zuckeranteile:

1. Erhöhung der Viskosität von Glycoproteinen in wäßriger Lösung.
Hierfür sind vor allem die an die Glycoproteine gebundenen Acylneuraminsäuren verantwortlich, da da sie wegen ihres niedrigen pK-Wertes beim physiologischen pH-Wert weitgehend dissoziieren. So dienen sie einerseits als Schmiermittel, andererseits als Schutz vor Austrocknung. Als Speichel machen sie die aufgenommenen Nahrungsstoffe gleitfähig und schützen aufgrund ihrer hohen Pufferkapazität die Schleimhäute des Magens vor der aggressiven Magensäure. DEMLING (16) weist ausdrücklich auf den Zusammenhang zwischen verringertem Speichelfluß und Magenulcus hin.
2. Schutz des Glycoproteins vor proteolytischem Abbau.
Hier spielt ebenfalls vor allem die Neuraminsäure eine entscheidende Rolle, da nach ihrer Abspaltung die entsprechenden Moleküle rasch abgebaut werden (17).
3. Träger des körpereigenen Erkennungs-codes.
Entscheidend für die Klassifizierung als körpereigen sind die in der Membranwand befindlichen Zuckerketten (ABO-System) (18).
4. Möglicherweise Wachstumsregulation der Zellen in den Organen.

5. Sie haben Transportfunktion (intrinsic factor, Transcortin, Transferrin, Ceruloplasmin).
6. Nicht völlig geklärt ist ihre Rolle in der Plasmamembran. Man vermutet, daß sie in Transportphänomenen und in der artspezifischen Antigenität eine Rolle spielen (Blutgruppensubstanzen).
7. Es wird vermutet, daß sie eine wesentliche Rolle in der Wachstumsregulation spielen.

1.5. Bedeutung der Zuckeranteile.

Eine der Hauptfragen war, inwieweit der Zuckeranteil die Eigenschaften der Glycoproteine beeinflusst. In vielen Fällen weiß man dies auch jetzt noch nicht, in einigen Fällen scheinen sich aber gewisse Gesetzmäßigkeiten abzuzeichnen.

Morrell und Mitarbeiter (20) haben den Abbau verschiedener desialysierter Plasmaglycoproteine in Ratten untersucht, wobei sie feststellten, daß neuraminsäurefreie Glycoproteine viel schneller aus der Blutbahn verschwanden, als diejenigen mit Neuraminsäure.

Choriongonadotropin (21) und FSH (Follikelstimulierendes Hormon) (22, 23) verlieren ihre biologische Aktivität nach Neuraminsäureabspaltung, ebenso das menschliche Luteinisierungshormon (24).

Auch Plasmapexin (25) kann nach Neuraminidase-Behandlung nicht mehr Histamin binden.

Im Gegensatz dazu ändert sich bei Transferrin, Haptoglobulin, Thyreoglobulin (26) und Transcortin (27) die Transportfunktion nicht, wenn Neuraminsäure entfernt wird.

1.6. Chemie der Glycoproteine.

Enthalten Glycoproteine wenig Kohlenhydrate, unterscheidet sich ihre Aminosäurezusammensetzung kaum von der kohlenhydratfreier Proteine (28). Steigt der Zuckergehalt aber auf 40 - 80 % an, so nehmen die aliphatischen Aminosäuren zu (Threonin, Serin, Prolin, Alanin und Glycin). Der Anteil dieser Aminosäuren kann im Falle der Mucina 60 - 70 % des Proteinanteils im Molekül ausmachen (29). Der Anteil der schwefelhaltigen und aromatischen Aminosäuren ist dann sehr gering oder sie fehlen sogar. Dies gilt auch für Blutgruppensubstanzen (30). Ein Glycoprotein, das nur als Threonin, Alanin und etwas Prolin besteht, wurde von De Vries (31) in einem arktischen Fisch gefunden.

Im Kohlenhydratenanteil findet man normalerweise nur wenige der theoretisch möglichen Zucker, nämlich Fucose, Galactose, Mannose, Glucosamin, Galactosamin (beide in der Regel N-acyliert) und Neuraminsäure (N-acyliert, manchmal zusätzlich O-acyliert). Der Zuckeranteil im Molekül kann zwischen unter 1 % bis zu 80 % variieren.

Zu den unangenehmsten Eigenschaften der Glycoproteine gehört, daß ihre Lösungen bei saurer Hydrolyse erst gelb, dann braun werden, und daß zum Schluß ein schwarzes, unlösliches Material ("Huminsäueren") ausfällt. Das ist nach GOTTSCHALK (32) der Hauptgrund für die lange Vernachlässigung dieses Verbindungstyps in der ersten Hälfte unseres Jahrhunderts, denn:

"... man konnte nicht viel Zutrauen zu analytischen Daten haben, die man bei der Untersuchung einer dunkelbraunen Flüssigkeit ... mit

kolorimetrischen Methoden erhielt."

MAILLARD (33, 34, 35, 36) beschrieb und untersuchte als erster diese Bräunungsreaktion, die später nach ihm benannt wurde. Diese Maillard-Reaktion spielt auch beim Erhitzen von Naturprodukten wie Milch und Eiern eine unangenehme Rolle (37).

Der Ausgangsschritt der Reaktion ist dabei die Bildung einer SCHIFF-schen Base, aus der nicht protonierten Aminogruppe der Aminosäure und der Aldehydgruppe des Zuckers (38).

Die Reaktion wird durch die Protonierung der Zuckerkarbonylfunktion gefördert (39).

Durch diese Reaktion wird die Ausbeute bei Aminosäureanalysen von Glycoproteinen spürbar vermindert.

1.7. Die Protein-Kohlenhydrat-Bindung.

Die Möglichkeiten einer kovalenten Bindung zwischen Protein und Kohlenhydrat sind begrenzt, da nur wenige Aminosäuren (Asparagin, Serin, Threonin, Hydroxyprolin und Hydroxylysin) in einer Proteinkette überhaupt zu einer Bindung fähig sind.

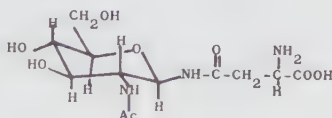
Bei den immer noch relativ wenigen auf ihren Bindungstyp untersuchten Glycoproteinen wurde festgestellt, daß in allen Fällen die Bindung glycosidisch ist und in der Regel ein Hexosamin enthält (40, 41). Nach den bisherigen Ergebnisse ergibt sich folgende Einteilung:

1.7.1. N-glycosidische Bindung.

Dieser Bindungstyp ist sehr häufig und beinhaltet die Amidgruppe von L-Asparagin und die reduzierende Gruppe von N-Acetyl-Glucosamin.

Die Bindung ist relativ stabil gegen Säuren und Basen.

Da sie außerdem gegen Säure etwas stabiler ist als die normalen glycosidischen Bindungen bei Heterosacchariden, war es möglich, eine Verbindung aus einem Zucker und Protein zu isolieren (42, 43, 44). Da die Verbindung (GlcNAc - Asn) auch synthetisiert wurde (45, 46, 47) wurde sie endgültig als 2-Acetamido-1-N- β -L-Aspartyl -2-deoxy- β -D-glucopyranosylamin identifiziert.



Man konnte bei dieser Bindung auch Aussagen über die Umgebung im Protein machen. So scheint die Erkennungsgruppe für die übertragende Glycotransferase die Gruppierung - Asn-X-(Ser,Thr)- zu sein (X = kleine Aminosäure, z.B. Glycin, Alanin, Isolencin, Lencin).

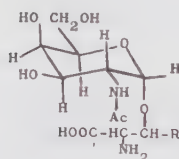
1.7.2. O-glycosidische Bindung.

Im Tierreich ist 2-Aceto-2-deoxy-D-Galactose glycosidisch ausschließlich an Serin oder Threonin gebunden.

Nur bei einigen Pflanzen- und Bakterienglycoproteinen wurde auch D-Xylose an Serin gebunden gefunden (48, 49).

Der Nachweis für die Existenz der O-glycosidischen Bindung basiert auf der β -Elimination im alkalischen Bereich bei substituiertem Serin und Threonin.

Schrittweise Reduktion ergab einen Alanin- und 2-Amino-Buttersäureanstieg, der dem Verlust von Serin und Threonin entsprach (50). Das gebildete Glycosylanion bildet ein Alditol. Es handelt sich vermutlich um 2-Acetamido-1-N-(4'-L-Seryl bzw. Threonyl)-2-deoxy- α -D-galactopyranosylamin.



R = H : Serin

R = CH₃ : Threonin

O-glycosidische Bindungen wurden auch mit Hydroxyprolin (51) und mit Hydroxylyxin (52, 53) in Extensin und Kollagen nachgewiesen.

1.7.3. Esterbindung.

Diese Bindung wurde in Schaf-submaxillarismucin vermutet. (66).

Neuere Studien (67) lassen jedoch vermuten, daß diese extrem alkalilabile Bindung in Glycoproteinen unmöglich vorkommen kann.

1.8. Glycoproteine aus Submaxillarisdrüsen.

Am besten von allen Glycoproteinen sind die Submaxillaris-mucine untersucht worden. Man kann sogar sagen, daß die Submaxillaris-mucine vom Schaf (Ovine submaxillary mucine = OSM) und vom Rind (Bovine submaxillary mucine = BSM) die beiden einzigen sind, die, was die Struktur des Kohlenhydratanteils betrifft, vollständig untersucht und aufgeklärt sind. Dies liegt vor allem daran, daß der Zuckeranteil sehr einfach konstruiert ist und nur zwei Komponenten hat.

1.8.1. Schafsubmaxillarismucin (OSM).

OSM enthält nur äquimolare Mengen von N-Acetyl-Neuraminsäure und N-Acetyl-Galactosamin als Zucker (68, 69). Die prosthetische Gruppe in OSM ist N-Acetylneuraminosyl (2 → 6) N-Acetyl-Galactosamin (70, 71) das an Serin und Threonin in α -Konfiguration (72) gebunden ist.

Es gibt im Molekül ca. achthundert Seitenketten, d.h. eine auf sechs Aminosäuren (73).

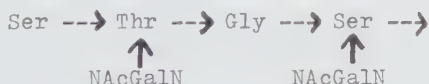
1.8.2. Rindersubmaxillarismucin (BSM).

Die wichtigste prosthetische Gruppe ist wie beim Schaf 6- α -D-Sialylpyranosyl-N-Acetyl-Galactosamin (54).

Im nativen Zusatznd enthält das Mucin verschiedene N- und O-Acyl-Neuraminsäuren (55, 56, 57).

Von BERTOLINI und PIGMAN (58) wurden noch weitere Oligosaccharide gefunden.

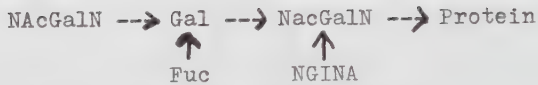
OZEKI und YOSIZAWA (59) vermuteten aufgrund ihrer Untersuchungen für ein BSM-Tetraglycopeptid folgende Struktur:



1.8.3. Schweinesubmaxillarismucin (PSM).

PSM ist schon weit weniger in seinem Zuckeranteil untersucht. Dieser scheint komplizierter gebaut zu sein und enthält außer Neuraminsäure und Galactosamin noch Galctose und Fucose (60, 61).

Es wurden zahlreiche Oligosaccharide isoliert (62, 63, 64) darunter ein Pentasaccharid mit der vermutlichen Struktur (65):



NGINA = N-Glycolyl-Neuraminsäure.

1.8.4. Pferdesubmaxillarismucin (ESM).

HUSER (78) untersuchte das Pferdesubmaxillarismucin. Dieses Mucin enthält Neuraminsäure, Fucose, Galaktose, Galaktosamin und Glucosamin. Der größte Teil des Kohlenhydrates ließ sich durch β -Elimination entfernen, was für eine O-glycosidische Bindung spricht. Für das Molekulargewicht wird ein Bereich zwischen 10^6 und 10^7 angegeben.

Der Proteinanteil unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung kaum von den übrigen Mucinen. Wie diese hat ESM auch Blutgruppen-A-Aktivität.

1.9. Theorien über die Biosynthese der Mucine.

Rindersubmaxillarismucin besteht aus ca. 150 kovalent gebundenen Glycopeptiden, die aus etwa 28 Aminosäuren ungefähr gleicher quantitativer Zusammensetzung bestehen (79, 80). Ähnliche "Untereinheiten" scheint es auch im PSM und bei Blutgruppensubstanzen zu geben. Man erhält diese Einheiten bei Behandlung des Glycoproteins mit Trypsin.

Das Vorkommen von gebrochenen Verhältniszahlen in dieser Untereinheit spricht dafür, daß diese Polypeptidketten aus einer homologen Familie von Glycopeptiden bestehen (81).

PIGMAN et al (82) vermuten deshalb, daß Glycoproteine in zwei Stufen hergestellt werden:

Die Ribosomen stellen kleine Peptide her und das

Gesamtprotein wird anschließend durch Polymerasen in den Golgi-Membranen "zusammengestrickt" (83). Dieses etwas ungewöhnlich anmutende Konzept der Proteinsynthese wird - nach Ansicht der Verfasser - durch das Vorkommen von ultrafiltrierbaren Peptiden in Schweine- und Rinder-Submaxillarisdrüsen gestützt (84).

Der Kohlenhydratanteil wird an den Zellmembranen (74, 75) vermutlich schrittweise (76) durch Transglycosidasen aus den aktivierten Zuckern an die Eiweißkette angehängt (77).

2. Abgrenzung der Arbeit.

Da bisher erst das Gesamtglycoprotein aus Pferdesubmaxillarismucin untersucht worden ist, sollen in der vorliegenden Arbeit Informationen über die Feinstruktur des Glycoproteins gewonnen werden.

Insbesondere sollen Struktur und Zusammensetzung der Kohlenhydratseitenketten und der umgehende Peptidanteil untersucht werden.

Es soll der Bindungstyp der Verknüpfungsstelle zwischen Protein und Kohlenhydratanteil geklärt werden.

Da noch recht wenig über die Biosynthese der Mucine bekannt ist, sollen Hinweise auf die Herstellung und Evolution der Mucine gewonnen werden.

3. Experimenteller Teil.

3.1. Herkunft des Materials.

Die Submaxillaris- (oder: Submandibularis-) Drüsen wurden frisch geschlachteten Pferden entnommen. Ursprünglich wurde das Material vom Schlachthof in Dortmund abgeholt. Da dort aber nur ein bis zwei Pferde im Monat geschlachtet wurden, fuhr ich später nur noch zum Schlachthof in Solingen-Ohligs, wo alle vierzehn Tage etwa sechs bis zehn Pferde geschlachtet wurden.

3.2. Aufarbeitung des Mucins.

Die Submaxillarisdrüsen, von denen eine etwa 50 bis 60 g wiegt, wurden folgendermaßen aufgearbeitet:

Das frische Material wurde mit Schere und Pinzette von anhängenden Fett- und Bindegewebe befreit, grob zerkleinert und in einem Mixer (Waring-Blender) homogenisiert.

Anschließend wurde das Homogenisat mit der zehnfachen Menge destillierten Wassers im Kühlraum bei 2 - 5°C etwa 24 Stunden extrahiert.

Um Bakterien am Wachsen zu hindern, wurde Toluol oder Natriumazid zugesetzt.

Danach wurde das ganze Material bei 8.000 Umdrehungen in der Minute - das entspricht 12.000 x g - zentrifugiert.

Der visköse, dunkelbraune Überstand wurde lyophilisiert.

Die Ausbeute betrug 11,4 % Rohmucin.

Zur weiteren Reinigung wurde das sehr gut lösliche Rohprodukt in destilliertem Wasser aufgelöst und mit Essigsäure bei pH 3 - 4 ausgefällt.

Unter diesen Bedingungen bleiben die nicht sauren Proteine in Lösung, während die sauren ausfallen.

Mit Cetyl - trimethyl - Ammoniumbromid (85) oder mit Äthanol (86) konnte darüber hinaus nichts gefällt werden.

Nach dem Zentrifugieren bei 8.000 U/min (entspricht 12.000 x g) wurde der Niederschlag in 0,01 molarem Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) wieder in Lösung gebracht.

Ein Teil der Lösung wurde im "blatch" - Verfahren mit Hydroxylapatit - hergestellt nach LEVIN (87) - behandelt und der Überstand gefriergetrocknet.

Da es vorallem darauf ankam, genügend große Mengen an Mucin für die anschließenden Proteasenbehandlungen zu erhalten, wurde auf eine zusätzliche Reinigung des Mucins mit Hilfe von Säulenchromatographie (88) verzichtet.

3.3. Enzymatische Spaltung des Mucins.

Um die Kohlenhydratseitenketten zu erhalten, mußte der Proteinanteil möglichst vollständig entfernt werden.

Sehr spezifische Proteasen, wie z.B. Trypsin oder Chymotrypsin kamen nicht dafür in Frage, da diese nur ganz bestimmte Bindungen angreifen. Dazu kommt, daß die dazugehörigen Aminosäuren in Mucinen ausgesprochen selten sind.

Günstiger ist die Verwendung unspezifischer Proteasen. Es wurden Pronase, Ficin, später auch Carboxypeptidase A und Aminopeptidase M ausprobiert.

3.3.1. Pronase.

Für die Enzymbehandlung wurden folgende Bedingungen gewählt (89):

Das Glycoprotein wird in einer Konzentration von 25 mg / ml in 0,01 molarem Trispuffer bei einem

pH-Wert von 7,8 in Gegenwart von 5 mMol Calciumchlorid aufgelöst.

Das Enzym wird in einer Konzentration von etwa 0,5 % des Proteingewichts zugegeben. Nach einem Tag wird die gleiche Menge noch einmal zugegeben.

Eventuell muß aufgrund der freiwerdenden Aminosäuren der pH-Wert mit Base nachgestellt werden.

Die Temperatur sollte 37° bis 39° C betragen.

Als Schutz vor Bakterien muß Toluol zugesetzt werden.

3.3.2. Ficin (90).

Eine 1 %-ige Proteinlösung in Natriumphosphatpuffer (0,1 Mol/l, pH = 0,7) wird mit EDTA (1mMol/l) und Mercatoäthanol (7 mMol/l) versetzt. Enzym wurde in einer Konzentration von 0,1 mg/ml zugegeben und über Nacht bei 37° C gehalten.

Zum Teil auch aus finanziellen Erwägungen wurde folgende Kombination für die endgültige Aufarbeitung genommen:

1 x Behandlung mit Ficin, anschließend 2 x mit Pronase. Da es sich herausstellte, daß eine weitere Pronasebehandlung erfolglos war, wurde versucht, mit Carboxypeptidase und Amino-peptidase weitere Aminosäuren abzuspalten. Leider gelang dies nicht, wie die Kontrolle mit der Dünnschichtchromatographie bewies. Diese letzteren Versuche werden im Rahmen der Untersuchungen zur Aminosäuresequenzanalyse beschrieben.

3.4. Reinigung der erhaltenen Glycopeptide.

3.4.1. Säulenchromatographie mit Molekularsieben.

Nach Ende der enzymatischen Verdauung wurden die Proben dialysiert, um Puffersalze zu entfernen.

Zuvor war sichergestellt worden, daß die interessierenden Glycopeptide den Dialyseschlauch nicht durchdrangen.

Nach dreitägiger Dialyse war nur 1 % des neuraminsäurehaltigen Materials im Dialysat nachweisbar. Die wieder aufgelösten Proben wurden auf mit Biogel P-4 und Sephadex G-25 bzw. G-50 gefüllten Chromatographiesäulen in 0,1 N Essigsäure als Puffer aufgetragen.

Die Glycopeptide erschienen bei Biogel P-4 und Sephadex G-25 im Ausschlußvolumen.

Die Verwendung von einmolaren Pyridin - Acetat - Puffer brachte keine Änderung.

Bei Verwendung von Sephadex G-50 tauchten die Glycopeptide im doppelten Ausschlußvolumen auf. Als Puffer wurde 1M Pyridinacetatpuffer verwendet.

Als Suchtests wurden für Neuraminsäure der "Bial-orcinol"-Test (kurz: "Bial-Test") nach SVENNERHOLM (91) und als allgemeiner Zuckertest der Phenol-Schwefelsäure-Test nach DUBOIS et al (92) benutzt.

Auf Hexosen wurde mit dem Anthron - Reagens geprüft (178) .

AUFARBEITUNGSSCHEMA



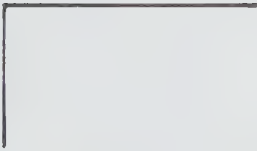
Pferdesubmaxillarisdrüsen



1. Homogenisation
2. Wassereextraktion
3. Lyophilisation



Rohmucin
(11,4 % Ausbeute)



in $\text{HCOCl}_3/\text{MeOH}$
lyse



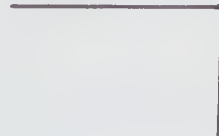
protein " A-O "
(% KH, color.)



1. CH_3COOH -Fällung
2. Lösen in Puffer
3. Überstand von
Hydroxylapatit
4. Dialyse
5. Lyophilisierung



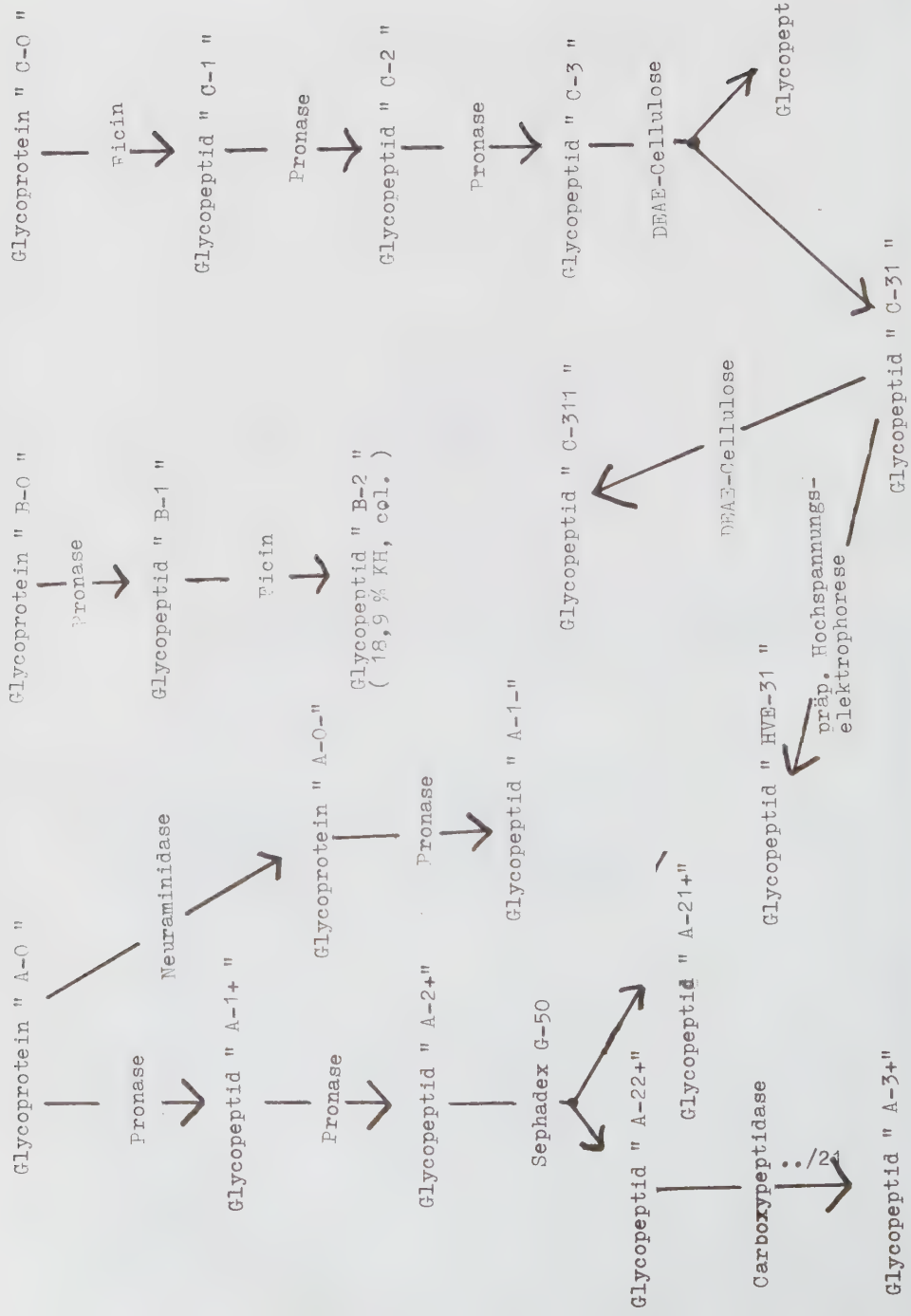
Glycoprotein " B-O "
(8,5 % KH, GC)



1. CH_3COOH - Fällung
2. Lösen in Puffer
3. Dialyse
4. Lyophilisation



Glycoprotein " C-O "
(2,7 % KH, GC)



3.4.2. Ionenaustauschchromatographie.

Zur weiteren Reinigung wurden die Glycopeptide über Dowex-50 Säulen geschickt. Als Puffer diente ein 0,1 M Natrium Phosphatpuffer (pH = 7,5), 0,1 N Essigsäure oder 1M Pyridinazetat (pH = 7).

Die Glycopeptide erschienen im Ausschlußvolumen. In einem weiteren Versuch wurde das gelchromatographisch gereinigte Proteolysenprodukt über eine DEAE -Cellulose- Säule geschickt. Dabei wurde ein Natriumphosphatpufferkonzentrationsgradient, (pH = 7,6) angelegt (178).

Es wurden dabei zwei Glycopeptide isoliert: das Hauptprodukt "C-31" (85,6 %) und eine zweite Komponente "C-32" (14,4 %).

3.4.3. Dünnschichtchromatographie.

Zur Kontrolle der Einheitlichkeit wurden die einzelnen Fraktionen auf Dünnschichtplatten in verschiedenen Systemen aufgetragen. Dabei stellte es sich heraus, daß in den Proben keine ninhydrinpositiven Verunreinigungen erhalten waren.

Da die Glycopeptide in den für Aminosäuren geeigneten Systemen nicht wanderten, wurde noch ein für die Auftrennung von Neuraminsäuren geeignetes System benutzt (Propanol/Wasser). Darin wanderten die kleinsten Glycopeptide genauso weit wie N-Acetyl-Neuraminsäure, während die nur mit Ficin behandelten Proben am Start liegen blieben.

3.4.4. Hochspannungselektrophorese.(179)

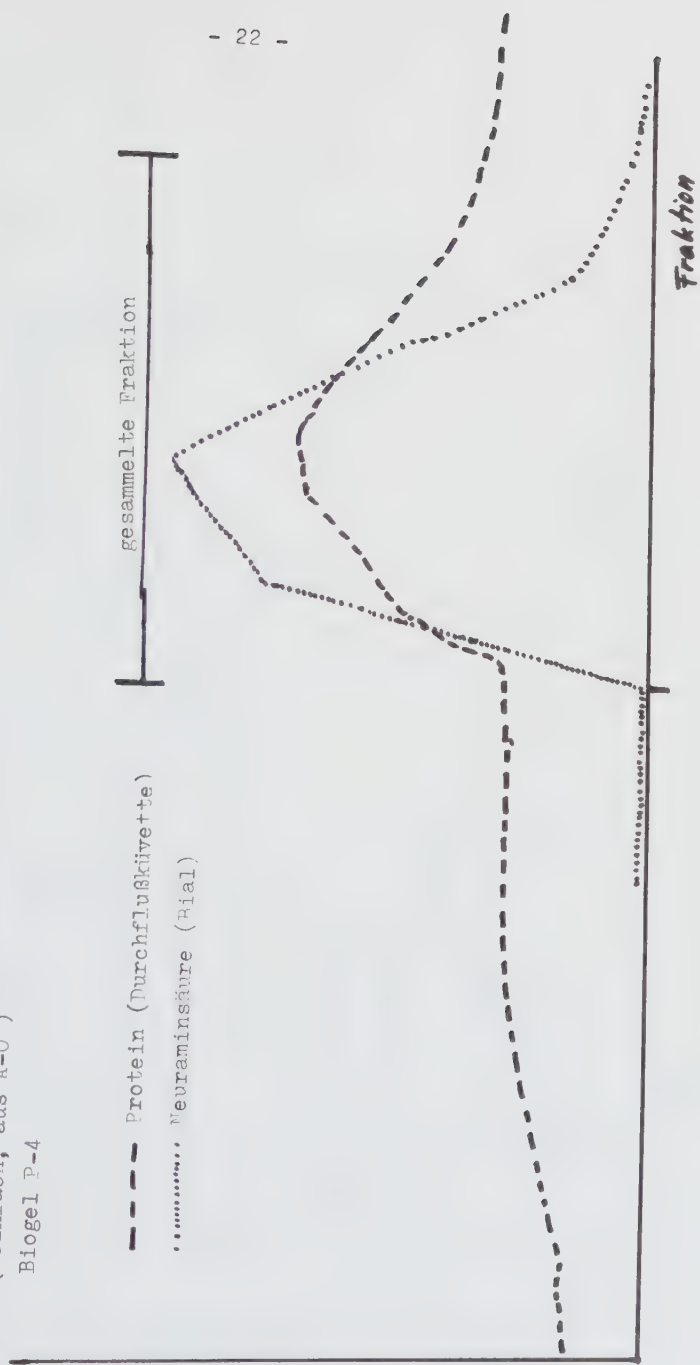
Die Fraktion C-31 wurde als Hauptprodukt einer präparativen Hochspannungselektrophorese unterworfen. Dabei wurde das Glycopeptid HVE-31 erhalten. Zuvor war durch Experimente bei verschiedenen pH-Werten festgestellt worden, daß die Glycopeptide C-31

und C-32 in der Hochspannungselektrophorese einheitlich sind und sich in ihrem Verhalten unter diesen Bedingungen nicht unterscheiden.

Als Sprühreagentien wurden 50 %-ige Schwefelsäure, Ninhydrin, Jod-Benzidin und Bial-Orcinol benutzt.

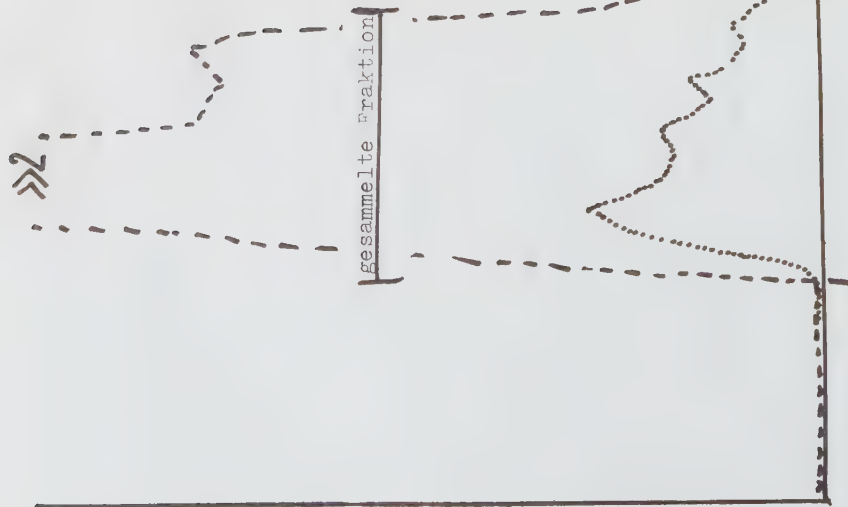
(180) .

Ergebnis der Pronasebehandlung von ESM
 (einfach, aus A-O)
 Biogel P-4

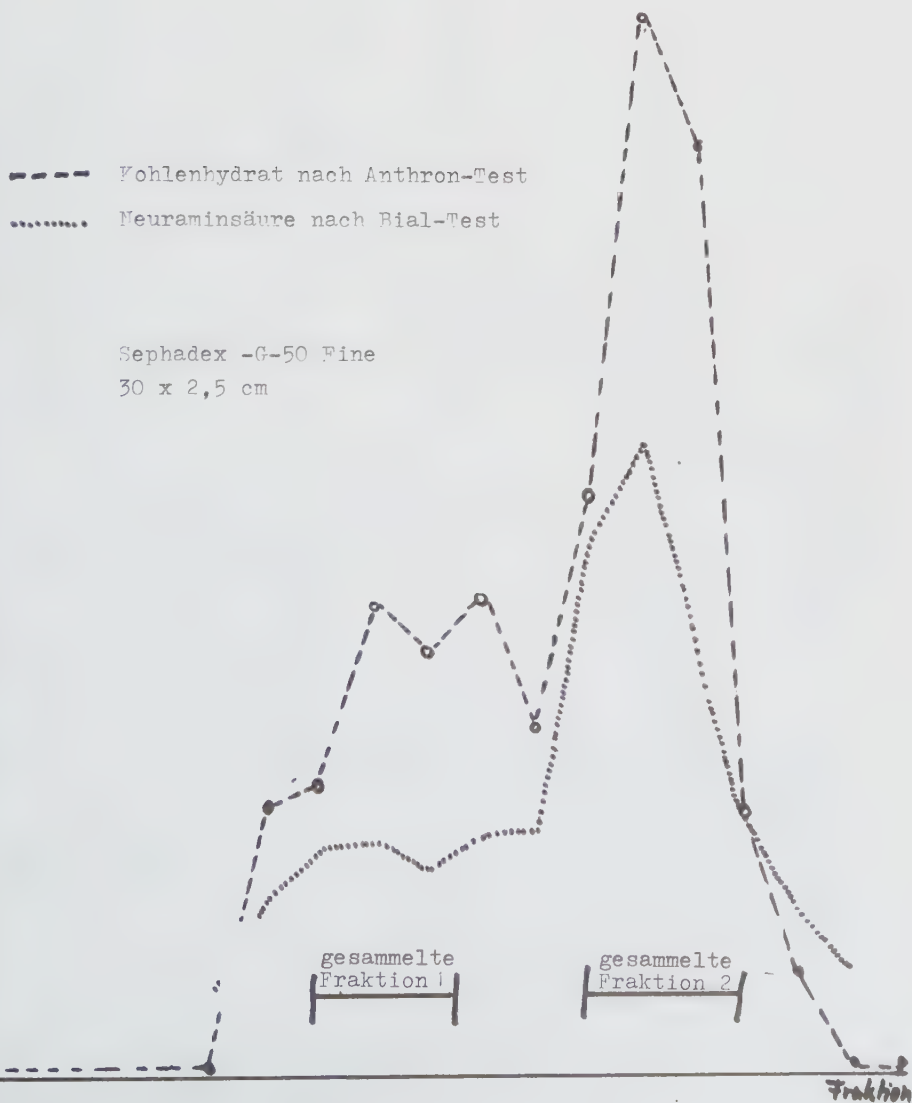


Ergebnis der Pronasebehandlung von ESM
Biogel P-4

- - - Kohlenhydrat mit Phenol/ H_2SO_4
- Neuraminsäure (Bial-Test)

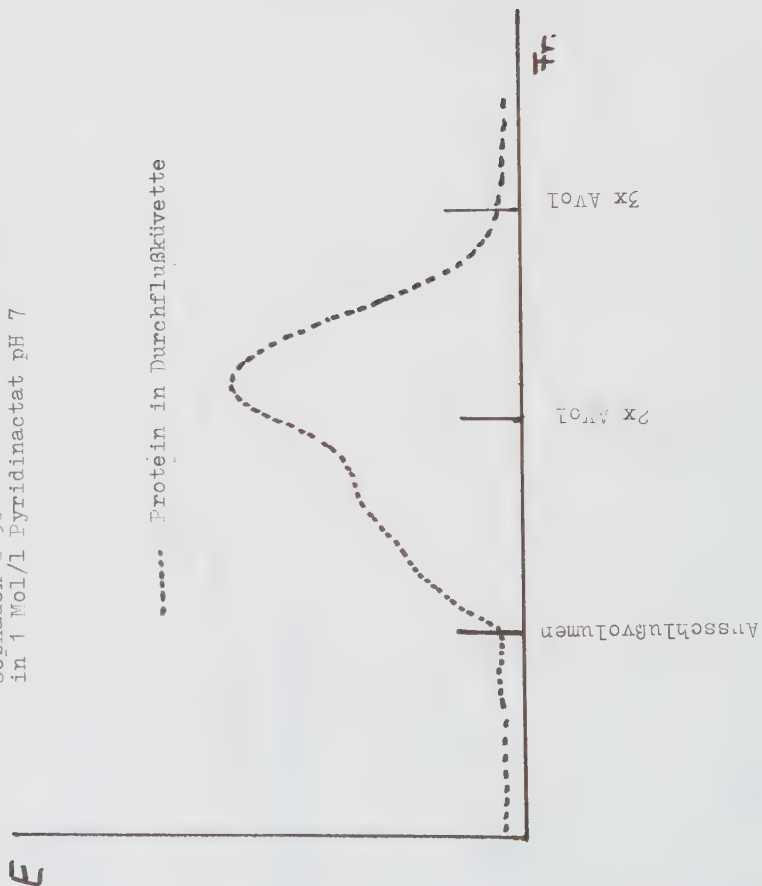


Ergebnis der Pronasebehandlung von ESM
(Zweifach, aus A-O)



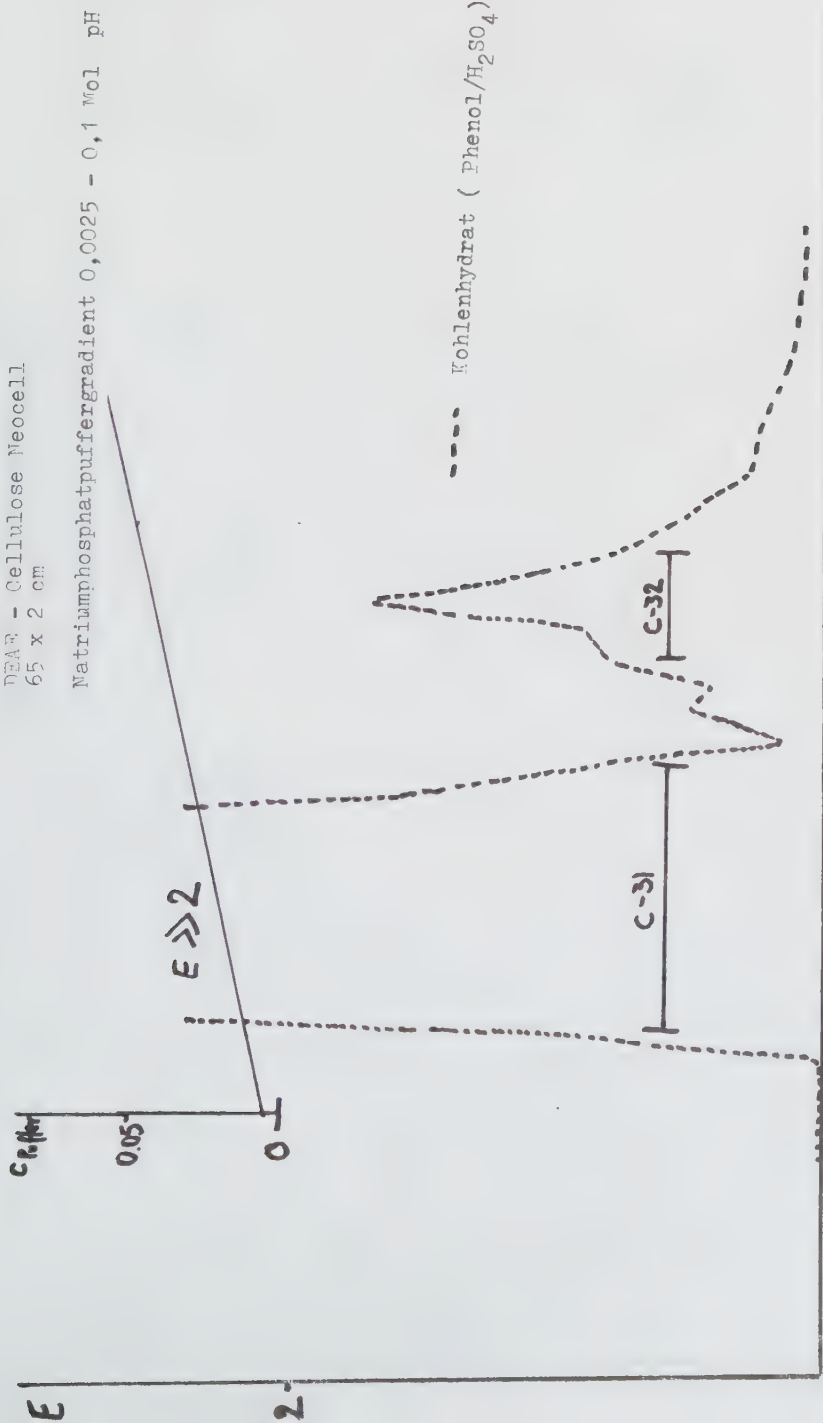
Ergebnis der Enzymbehandlung von ESM
(1x Ficin, 2x Pronase)

Sephadex G-50
in 1 Mol/l Pyridinacetat pH 7



DEAR - Cellulose Neocell
65 x 2 cm

Natriumphosphatpuffergradient 0,0025 - 0,1 Mol pH 7,3



Ergebnis der mehrfachen Enzymbehandlung von ESM
1x Ficin, 2x Pronase

DEAE-Cellulose Neocell

65 x 2 cm

Natriumphosphatgradient pH 7,6 0,0025 - 0,1 Mol/l

1 = HSM-C/3 [12-19] = C-31

2 = HSM-C/3 [27-33] C-32

← 1 →

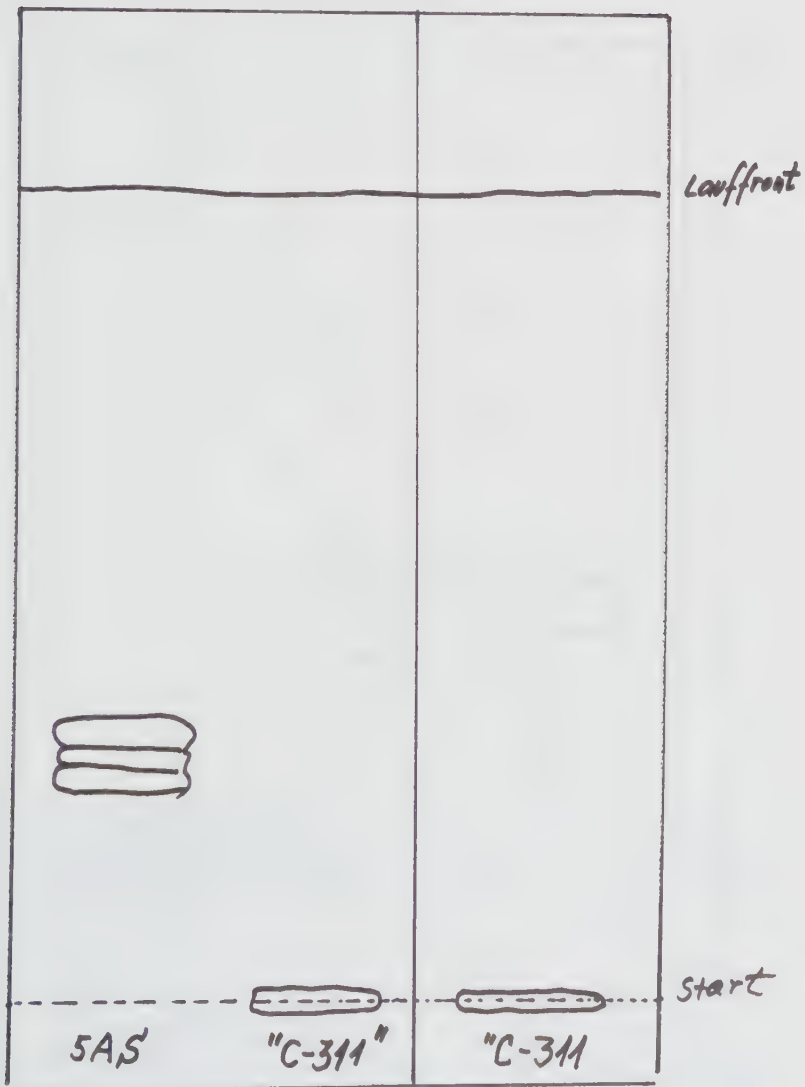
← 2 →

→ alles unter 0,2

Dünnschichtchromatogramm zur Erkennung von Aminosäuren

CH_3COOH / n-Butanol / H_2O (1 : 4 : 5)

t = 4,5 h



1. Ninhydrin-Färbung
2. Cl_2 /Benzidin

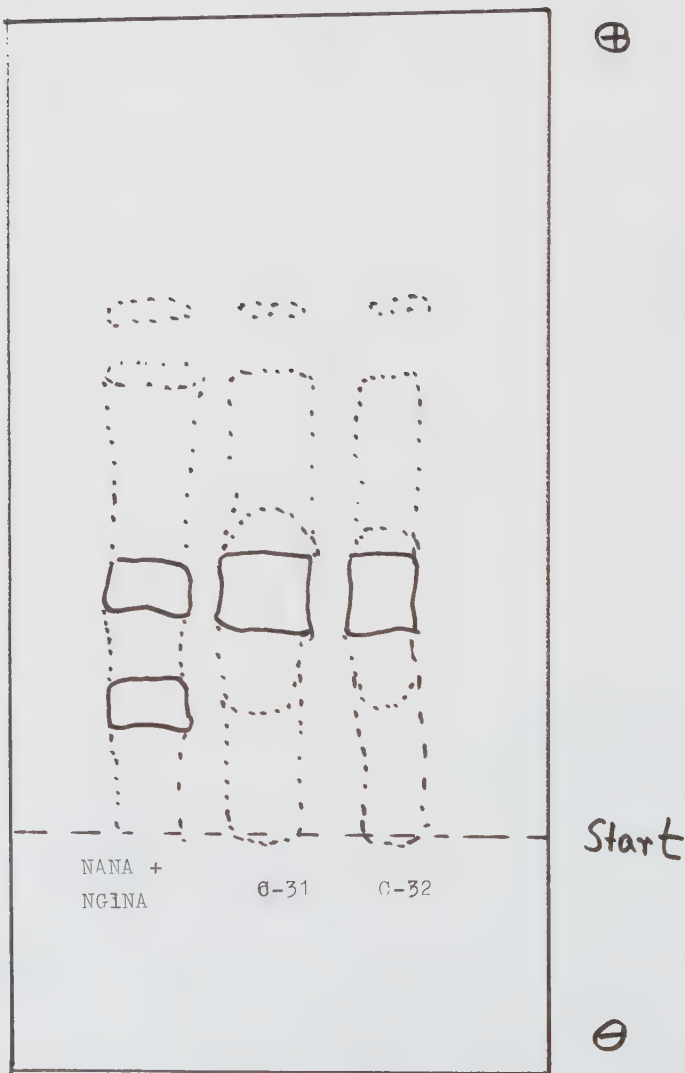
Bial-Färbung

Ref.: Ser, Thr, Ala, Gly, Pro

Hochspannungselektrophorese

1000 V, 32mA, 120 min

1Mol/l PyAc pH 6,4

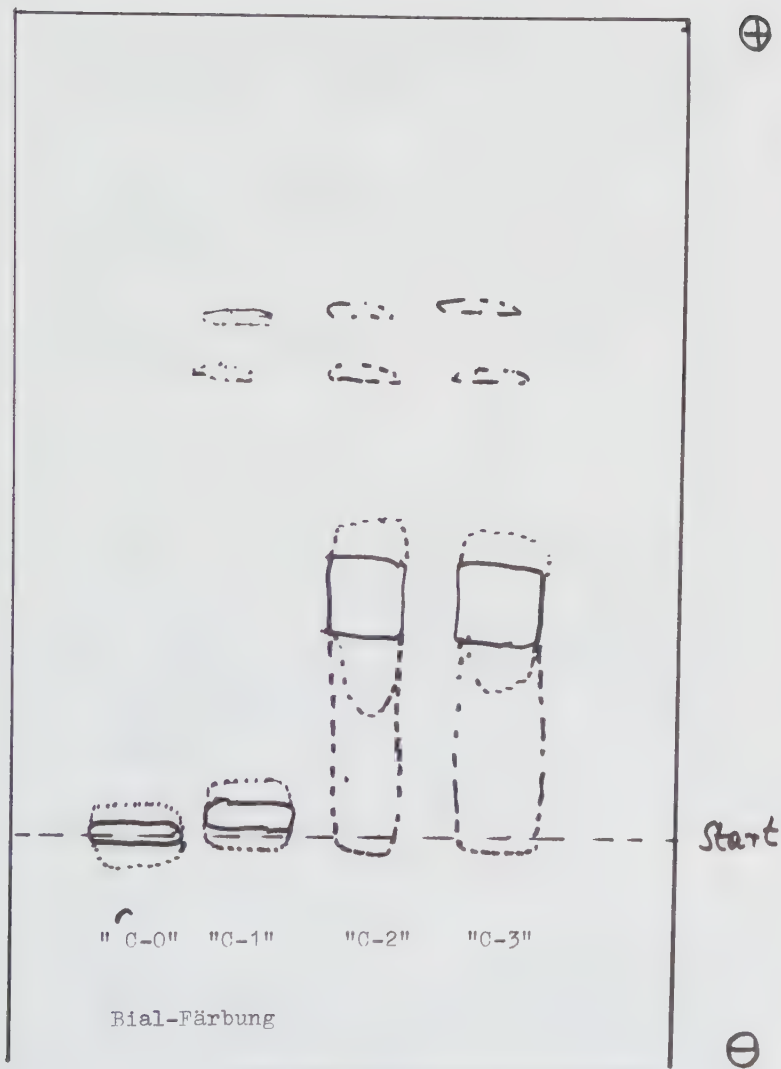


Bial-Färbung (Neuraminsäure)

Hochspannungselektrophorese

1000 V, 32 mA, 120 min

1 Mol/l PyAc pH 6,4



3.5. Reinheitskriterien.

Alle untersuchten Spaltprodukte waren gelchromatographisch einheitlich. Gesammelt wurde immer die Neuraminsäure-haltige Fraktion, die sich mit der zuckerhaltigen deckte.

Durch Ionenaustauscherchromatographie ließ sich diese Fraktion in zwei Bestandteile auflösen, die auf der Dünnschichtplatte und in der Hochspannungselektrophorese einheitlich und frei von Verunreinigung durch Aminosäuren und anderen Peptiden waren. Das durch Hochspannungselektrophorese nachgereinigte Hauptprodukt ("HVE-31") wurde einer Endgruppenanalyse unterworfen.

Bei der Hydrazinolyse (93) wurden 6,1 % Serin, 3,3 % Glycin und 5,3 % Alanin - bezogen auf den jeweiligen Gehalt an der betreffenden Aminosäure als 100 % - am Carboxylende des Peptids gefunden, das heißt ca. 2 - 3 % des Peptidanteils konnte nur abgespalten werden.

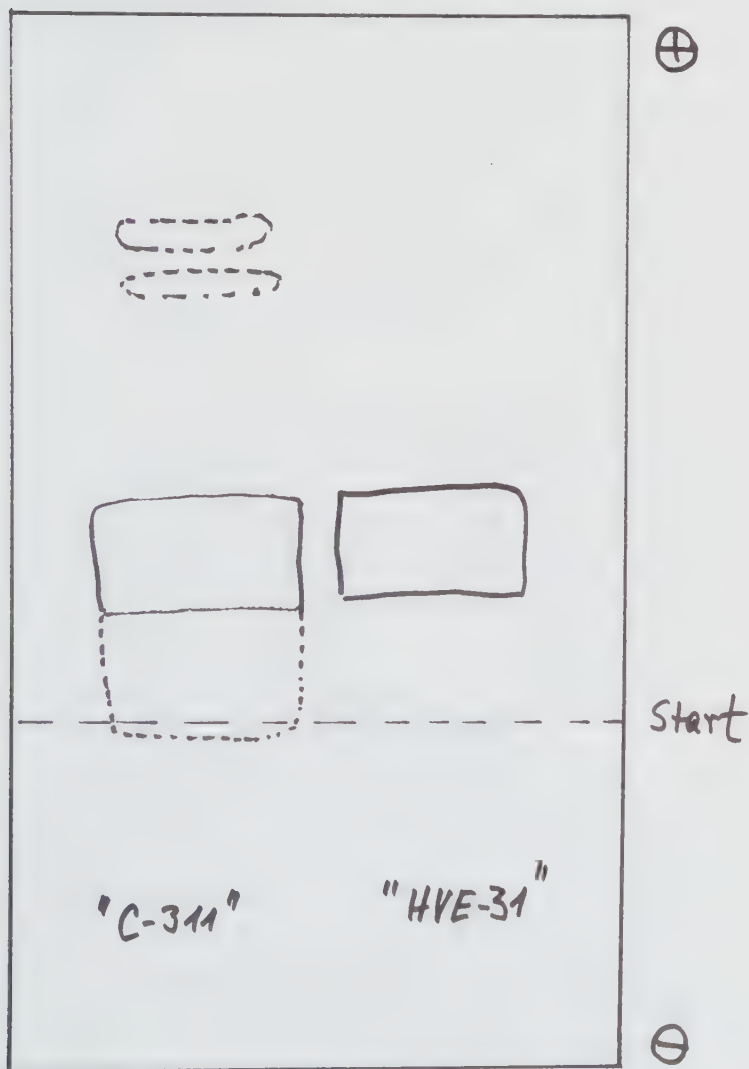
Bei der Dansylierung (94) wurde als einziges Produkt außer DNS-OH, DNS-NH₂ und einigen kaum sichtbaren Flecken nur ein intensiv gelber Fleck gefunden, der nur in Benzol/Eisessig (9 : 1 v/v) gewandert war.

Hochspannungselektrophorese

1000 V, 100 min,

1 Mol/l Pyridinacetat pH 6,4

Vergleich Ionenaustausch- und HVE-Nachreinigung
Rial-Färbung (Neuraminsäure)

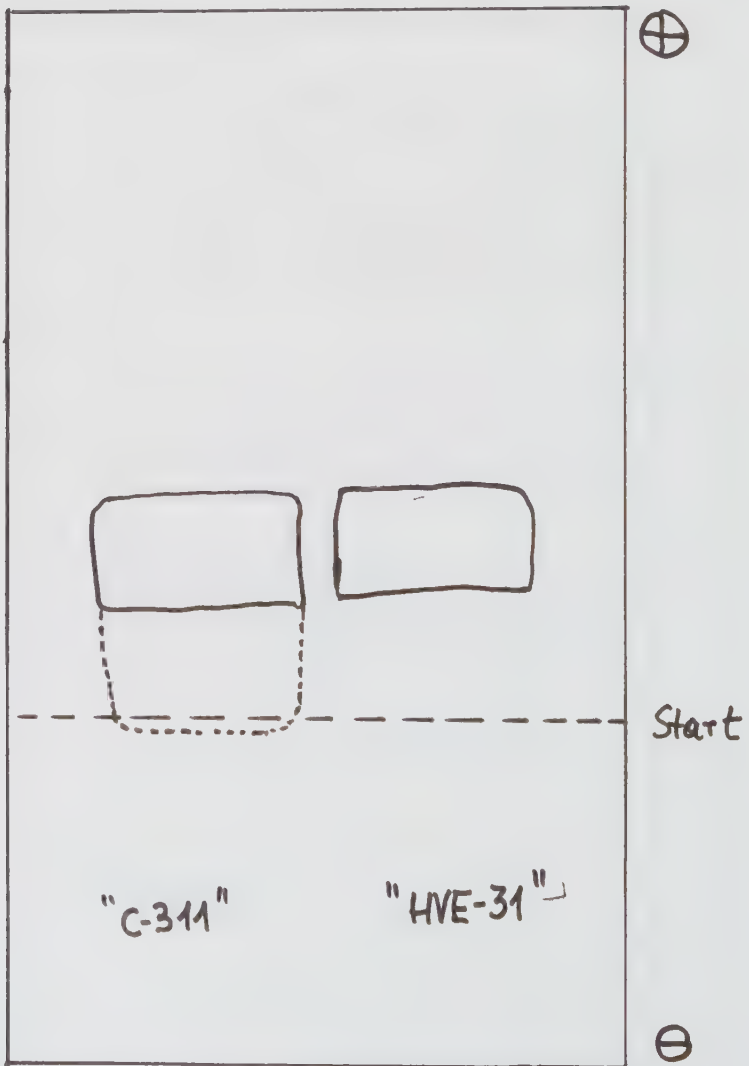


Hochspannungselektrophorese

1000 V , 100min,

1 Mol / l Pyridinacetat-Puffer pH 6,4

Vergleich Ionenaustausch- und HVE-Nachreinigung



1. Ninhydrin

2. Cl_2 /Benzidin

3.5. Untersuchung des Kohlenhydratanteils.

3.5.1. Das Gesamtmucin.

Die Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils des Pferdesubmaxillarismucins wurde von HUSER (100) untersucht.

Er fand mit kolorimetrischen Methoden folgende Werte:

Neuraminsäure (als N-Acetyl-Neuraminsäure):	11,5 %
Fucose:	8,0 %
Galactose:	18,3 %
Hexosamine (Galactosamin + Glucosamin):	20,1 %

Im Aminosäureanalysator fand er:

Galactosamin:	5,0 %
Glucosamin:	2,5 %

Das ist etwa ein Drittel des kolorimetrischen Wertes. Es ist deshalb anzunehmen, daß diese viel zu hoch liegen.

Die in ESM vorkommenden Acylneuraminsäuren wurden von SCHAUER (101) bestimmt. Er gibt folgende Werte an:

N-Glycolyl-Neuraminsäure	1 - 2 %
N-Acetyl-Neuraminsäure	15 - 20 %
N-Acetyl-4-O-Acetyl-Neuraminsäure:	70 - 75 %
N-Acetyl-4,?-di-Acetyl-Neuraminsäure:	2 - 5 %
Bezogen auf der Gesamtgehalt an Neuramin:	100 %

Über aus ESM isolierten Glycopeptiden liegen in der Literatur keine Werte vor.

3.5.2. Untersuchung des Kohlenhydratanteils der Glycopeptide.

Um die einzelnen Komponenten des Zuckeranteils der durch die enzymatischen Spaltungen entstandenen Glycopeptide zu erkennen, wurde als modernstes Verfahren die Gaschromatographie eingesetzt, da die älteren kolorimetrischen Verfahren ungenauer sind.

3.5.2.1. Gaschromatographie.

Grundsätzlich standen dabei zwei Aufarbeitungsmethoden zur Auswahl:

- a. Direkte Bestimmung der Zuckerderivate (95, 96).
- b. Reduktion der Zucker und Bestimmung der Alditolderivate (97).

Methode 2 hat den Vorteil, daß jedes Alditol jeweils nur einen Peak ergibt, der leicht quantitativ ausgewertet werden kann, während bei der anderen Methode mehrere Peaks (furanoid und pyranoid, α - und β -Anomere) entstehen.

Dadurch wird zwar die quantitative Auswertung erschwert, dafür hat man aber aufgrund des charakteristischen Peakmusters die Gewißheit, nicht das eigentliche Zuckerderivat mit einem Zersetzungsprodukt zu verwechseln, das zufällig an der gleichen Stelle erscheint.

Dies ist bei Glycopeptiden besonders wichtig, da die hier bei der Hydrolyse entstehenden freien Aminosäuren und Zucker sehr leicht miteinander reagieren, z.B. in der MAILLARD-Reaktion (98) und sogenannte Huminsäuren bilden.

Bei der Derivatisierung wurde der von REINHOLD (99) vorgeschlagenen Methode gefolgt.

Als Säulenmaterial wurden eine 6 Fuß lange Stahlsäule und eine 12 Fuß lange Glassäule mit 0,05 % OV-17-Organosilikon gepackt benutzt, die selbst gestopft werden waren.

Die Proben wurden mit einem Temperaturprogramm von 100° - 280° C mit einem Temperaturanstieg von 10° C in der Minute gefahren.

Die Peakflächen wurden anfangs mit einem KENT chromalog 2 bestimmt, später wegen der häufigen Ausfälle des Gerätes oft mit der Hand.

Das Glycoprotein (etwa 5 mg, je nach Kohlenhydratgehalt) wird zusammen mit 0,200 mg Inosit in einem verschließbaren Derivatisierungsröhrchen mit 1 ml 500 mMol/l HCl in absolutem Methanol 16 h bei 65° C gehalten (vergl. 102).

Nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom wurde zur Recetylierung der Amidgruppen 0,1 ml Pyridin und 0,1 ml Essigsäure - Anhydrid zugegeben. Die Proben wurden sofort eingedampft bis zur Trockne. Die dabei eingetretene O-Acetylierung wurde durch einstündige Behandlung mit 1 ml 500 mMol/l methanolischer HCl wieder rückgängig gemacht. Nach dem Trocknen waren die Proben bereit zum Derivatisieren.

Pyridin, Hexamethyldisilazan und Trimethylchlorosilan wird vorsichtig im Verhältnis 10 : 2 : 1 Frisch gemischt. Von diesem Silylierungsmittel werden 0,1 ml den Proben zugefügt. Andere Silylierungsmittel hatten keine so guten Ergebnisse gezeigt. Nach 15 Minuten konnte man die Proben auf den Gaschromatographen aufspritzen. Dabei wurde die "solvent flush" Methode angewandt, d.h. 1 ul Äthylacetat wurde in die Spritze aufgezogen, dan 1 ul Luft und dann erst die Probe (1 - 2 ul). Damit wurden beim Aufspritzen alle Probenreste mitgespült.

Im Silylierungsmittel hielten sich die Proben einige Tage im Tiefkühlschrank.

Bei dieser Methode werden die verschiedenen Neuraminsäuren in N-Acetyl-Neuraminsäure umgewandelt. Außerdem wurde etwas Fucose abgebaut.

Das Temperaturprogramm wurde bereits beschrieben.

Es wurde ein "flame ionization detector" ("FID") benutzt.

Die Genauigkeit der Ergebnisse beträgt 5 %.

Es wurden nur folgende Zucker gaschromatographisch gefunden:

Fucose,

Galactose,

N-Acetylglucosamin,

N-Acetylgalactosamin,

N-Acetylneuraminsäure.

Diese Zucker waren in allen untersuchten Glycopeptiden vorhanden. Die Einzelergebnisse sind der umseitigen Tabelle zu entnehmen.

Ergebnisse der Zuckeranalysen in mmol/g.

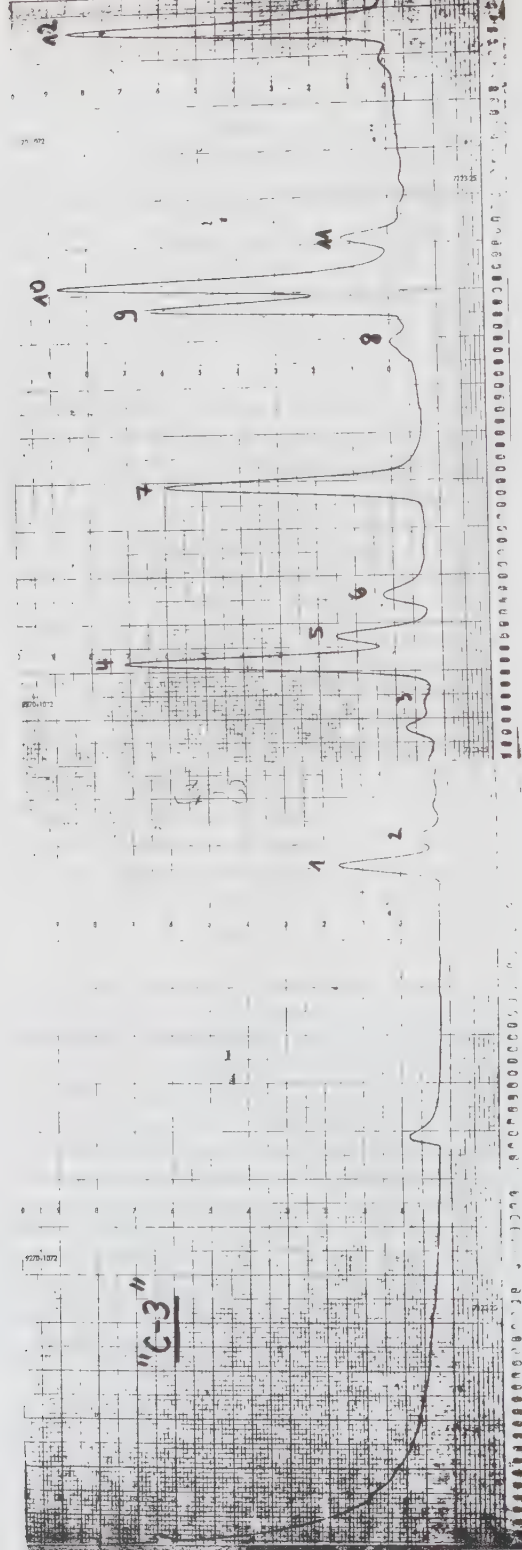
1. über 6ft Stahlsäule:

	FUC	GAL	AcN-HEX	NANA
A-22+	0,11	0,22	0,63	0,41
A-21+	0,31	0,36	0,99	0,36
A-1-	0,37	0,35	0,66	0,09
A-3+	0,23	0,37	0,93	0,57
B-0	0,03	0,08	0,14	0,11
C-0	0,02	0,03	0,04	0,02

2. über 12ft Glassäule:

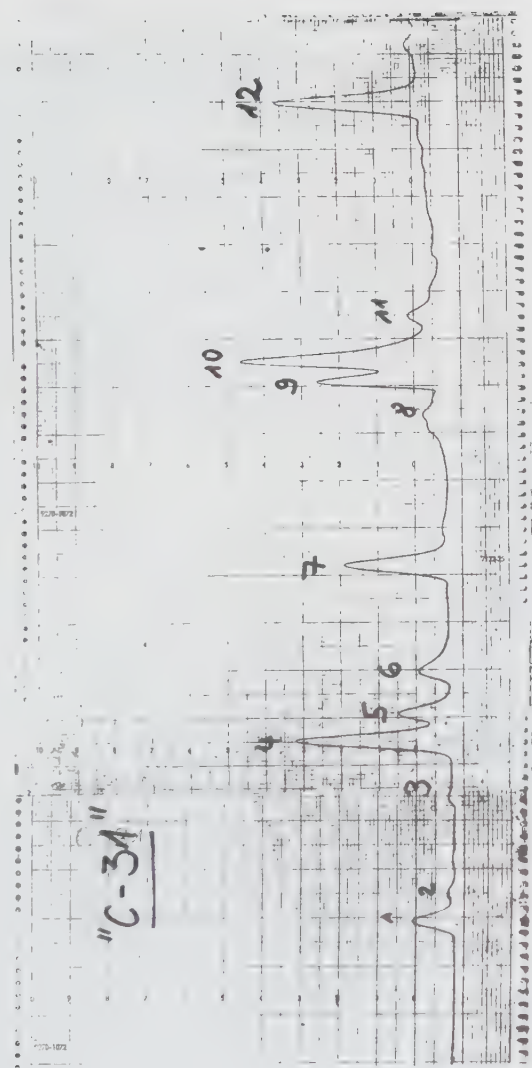
C-1	0,09	0,21	0,25	0,16
C-2	0,11	0,23	0,37	0,20
C-3	0,19	0,41	0,59	0,27
C-31	0,14	0,35	0,68	0,36
C-32	0,19	0,62	0,64	0,32
C-311	0,11	0,39	0,86	0,50

Ergebnis der Enzymbehandlung von ESM
Zuckeranalyse (GLC)
1x Ficin, 2x Pronase



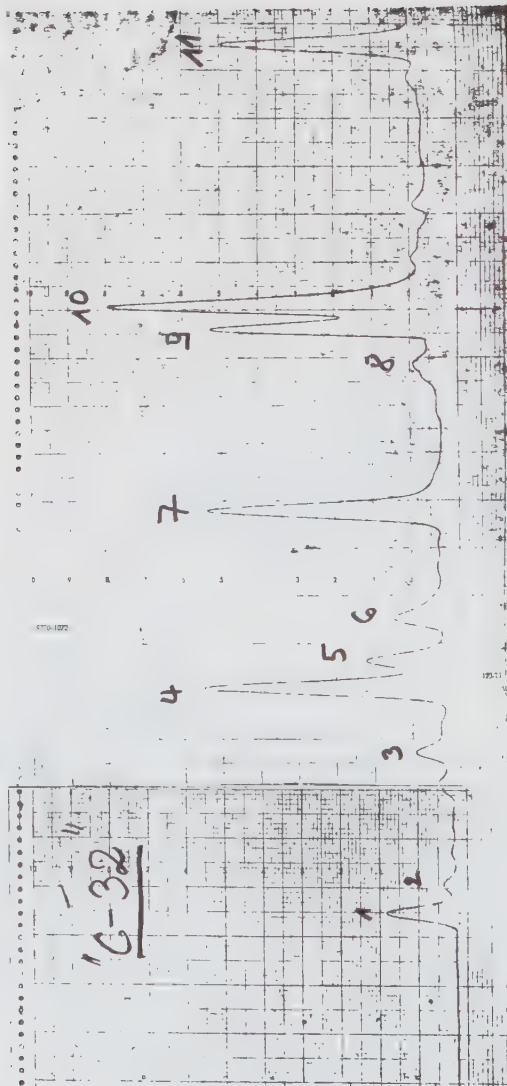
Ergebnis der Enzymbehandlung von ESM
Zuckeranalyse (GLC)
1x Ricin, 2x Feronase

1. Fraktion über DEAE-Cellulose



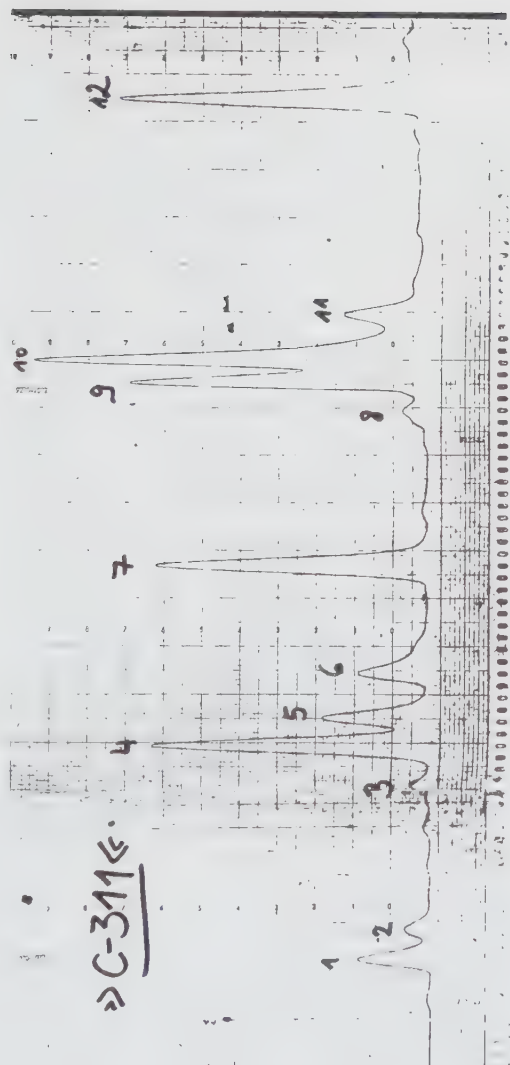
Ergebnis der Enzymbehandlung von ESM
Zuckeranalyse (GIC)
1x Ficoll, 2x Pronase

2. Fraktion über DEAE-Cellulose



Ergebnis der Enzymbehandlung von ES¹⁰⁰
Zuckeranalyse (GLC)
1x Vicin, 2x Trionase

" C-31 " nachgereinigt



ERLÄUTERUNG der GLC-Abbildungen :

Trimethylsilyl - Derivate

Temperaturprogramm : 100 - 250° C , 10° C / min Temp.Anstieg
10° C / min , Temperaturanstieg

Abschwächung : $4-32 \times 10^3$

Detektor : Flammenionisationsdetektor (FID)

Gerät : Hewlett-Packard

Integrator : KENT chromalog 2

Peakzuordnung :

- 1, 2, Fucose
- 3, 4, 5, 6, : Galactose
- 7 : meso-Inositol (Interner Standard)
- 8, 9, 10 : Galactosamin
- 9, 10, 11: Glucosamin
- 12 : N-Acetyl-Neuraminsäure

Retentionszeiten (relativ zu meso-Inositol) :

- 0,58 Fucose
- 0,70 Mannose
- 0,77 Galactose
- 0,86 Glucose
- 1,00 m-Inositol
- 1,14 Galactosamin
- 1,19 Glucosamin
- 1,45 N-Acetyl-Neuraminsäure

Es ist der jeweils höchste Peak angegeben.

3.6. Versuche zur Massenspektrometrie.

3.6.1. Die Methylierung von Zuckern.

Kohlenhydrate können durch Umwandlung von Hydroxylgruppen in Alkoxyde methyliert werden. Auf diese Weise hat man ein elegantes Mittel in der Hand, um die Verknüpfungs- und Verzweigungsstellen der Kohlenhydratseitenketten zu bestimmen. Man geht dabei folgendermaßen vor:

Unter Einfluß von Base (Na, NaH, OH, NH_2 , Ag_2O , BaO, Methyl-sulphinyl-carbanion) wandeln sich die Zucker in die entsprechenden Alkoxyde um. Anschließend wird in einer nukleophilen Reaktion mit einem Alkylierungsmittel (Methyljodid, Dimethylsulfat) methyliert.

Dabei sind folgende Methoden beschrieben:

3.6.1.1. Methode nach Purdie.

Die Verbindung wird unter Rückfluß in Methyljodid in der Gegenwart von Ag_2O erhitzt (103, 104). Dabei muß auf absolute Trockenheit geachtet werden. Um vollständige Methylierung zu erreichen, muß die gesamte Prozedur mit frischem Material wiederholt werden. Die Zucker werden dabei teilweise zu Säuren oxidiert.

3.6.1.2. Methode nach Kuhn.

Diese Reaktion wird bei Raumtemperatur mit Silberoxid und Methyljodid in Dimethylformamid als Lösungsmittel durchgeführt (105). Bei Polysacchariden muß der Vorgang mehrmals wiederholt werden. Mit dieser Methode wurden Glycopeptide vom Glucosamin-Asparagin- Bindungstyp aus Ovalbumin, Aspergillus oryzae- Amylase, Bromelain (106) und Taka-Amylase (107) untersucht.

Acetamidogruppen werden in Gegenwart von Ag_2O teilweise oxidiert. Dies kann durch Verwendung von Bariumoxid weitgehend verhindert werden (108, 109, 110, 111).

Auf diese Weise wurden verschiedene Aminosucker enthaltende Glycoproteine und -peptide untersucht (112, 113, 114, 115, 116). Auch Sialinsäurehaltige Verbindungen wurden methyliert (117, 118).

Der Nachteil des Kuhn-Verfahrens ist das Auftreten von Abbauprodukten. (119). Außerdem werden Acetyl-Gruppen teilweise nicht durch MeO-Gruppen ersetzt. (120, 121).

3.6.1.3. Methode nach Haworth.

Bei dieser Methode wird eine wäßrige Lösung von Kohlenhydraten mit 5 - 10 Mol/l Natriumhydroxid behandelt (122, 123). Als Methylierungsmittel dient Dimethylsulfat. Ist am Anfang der Reaktion zuviel Alkali im Verhältnis zum Alkylierungsmittel vorhanden, kann es zum raschen Abbau der Zucker kommen.

Diese Methode wird heute kaum angewandt, da sie für kleine Mengen nicht besonders geeignet ist.

3.6.1.4. Methode nach Hakamori.

Behandelt man Kohlenhydrate mit Methylsulphinyllcarbanion in Dimethylsulfoxid mit anschließender Addition von Methyljodid, so erreicht man eine quantitative Methylierung in einem einzigen Schritt (124).

Die Base wird durch Behandlung von frisch destilliertem Dimethylsulfoxid mit Natriumhydrid unter absolut trockenem Stickstoff bei 50 - 65°C hergestellt (125, 126, 127, 128).

Die Alkoxide haben sich gebildet, sobald sich eine grünliche sehr zähe Flüssigkeit gebildet hat (ca. 1 h). Anschließend wird unter Eiskühlung Methyljodid zugegeben.

Während der Basenbildung und der Methylierung wird mit Ultraschall homogenisiert.

3.6.2. Solvolyse der methylierten Kohlenhydrate.

Für die Solvolyse sind verschiedene Verfahren beschrieben (129, 130, 131, 132, 133):

- a. Methanolyse
- b. Formolyse
- c. Hydrolyse durch verdünnte Schwefelsäure

Es gilt auch hier, daß 2-deoxy-Aldosen (z.B. Fucose) und 3-deoxy-Ulonsäuren (z.B. Neuraminsäure) sehr empfindlich gegen Säure sind.

Man muß bei der Aufarbeitung daran denken, daß die entstehenden Produkte sehr flüchtig sind.

Neuerdings wird auch die Acetolyse benutzt (95 % Essigsäure / 0,5 N H_2SO_4 , 80 %-ige Essigsäure / 0,7 N H_2SO_4 , 80° C) (134, 145, 136, 137, 138).

3.6.3. Identifikation.

Man erhält bei der Solvolyse ein Gemisch der verschiedenen Anomere. Diese kann man - außer mit den älteren Trennverfahren wie Dünnschicht- und Säulenchromatographie - sehr elegant mit GLC-MS-Kopplung (d.h. gaschromatographische Trennung mit anschließender Massenspektroskopie) identifizieren.

Um die Arbeit zu vereinfachen, werden die Zuckermethyläther zu den entsprechenden Alditolen mit Natriumborohydrid reduziert.

Die entstandenen freien Hydroxylgruppen werden als Trimethylsilyläther (139), Trifluoroacetate (140, 141, 142) oder Acetate (143, 144, 145) bestimmt.

Die Alditol-Acetat-Methode wird dadurch eingeschränkt, daß aus bestimmten verschiedenen Verbindungen das gleiche Alditol entsteht, wie z.B. 2,4- oder 3,5-Methylhexosen. Dies kann man vermeiden, indem man mit Natriumborodeuterid reduziert.

3.6.4. Durchführung.

Aufgrund der Literaturangaben erschien die Methode nach HAKOMORI als das eleganteste und erfolgversprechendste Methylierungsverfahren.

Da aus der Gaschromatographie schon zufriedenstellende Ergebnisse vorlagen, wurde beschlossen, die dort benutzten Verfahren für das vorliegende Problem anzuwenden.

Mit Methylglucosid wurde der folgende Arbeitsgang durchgetestet:

1. Methylierung nach HAKOMORI.
 - a. Herstellung des Methylsulfinyl-Carbanions
 - b. Erzeugung des Alkoxids
 - c. Methylierung mit Methyljodid
2. Solvolyse mit 500 mMol/l methanolischer HCl bei 65° C über 16 Stunden.
3. Reduktion mit Natriumborohydrid (146).
4. Herstellung von Alditolacetaten (Pyridin/Essigsäureanhydrid im Verhältnis 1 : 1, 1 Stunde bei 100° C).
5. Kontrolle der Vollständigkeit der Methylierung mit Hilfe der Gaschromatographie (OV - 17; 80 - 250° C; 10° C Temperaturanstieg pro Minute).

Der letzte Punkt ist ganz besonders wichtig, da mit der Vollständigkeit der Methylierung steht und fällt.

Dieses Verfahren wurde nun mit Methylglucose ausgetestet und brachte einwandfreie Ergebnisse. Daraufhin wurde der Versuch unternommen, auch das Hauptglycopeptid in seiner reinsten Form ("HVE-31") zu methylieren.

Dazu waren einige Änderungen erforderlich.

So mußte das Glycopeptid vorher acetyliert werden, da vollständige Blockierung der Aminogruppen die Reaktion erleichtern soll (147). Außerdem wurde die Löslichkeit des Glycopeptids in Dimethylsulfoxid ganz wesentlich verbessert.

Außerdem wurde das Reaktionsgemisch nach Abdestillieren des überschüssigen Methyljodids und Verdünnen mit Wasser und vor dem Extrahieren mit Chloroform in einem Dialyseschlauch gegen Wasser dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Neutralisation war mit Dowex erfolgt (bzw. HCl).

Die ganze Prozedur wurde zur Kontrolle mit Methylglucosid mit den gleichen Reagentien parallel durchgeführt.

Im Gaschromatogramm stellte es sich heraus, daß zuviele Zersetzungsprodukte entstanden waren, sodaß eine weitere Untersuchung mit der Massenspektrometrie nicht mehr sinnvoll erschien.

Da die Kontrollprobe einwandfrei war, scheint die Ursache dafür nicht bei den verwendeten Reagentien zu liegen.

Da in der Literatur (148) schon von ähnlichen Schwierigkeiten berichtet wird, muß man annehmen, daß durch die extrem alkalischen Bedingungen die β -Eliminierung gefördert wird und die Peptidkette und insbesondere die Seryl- und Threonyl -Kohlenhydrat-

Bindungen zerstört werden.

An der Neuraminsäure dürfte es nicht liegen, da diese stabil gegen Methylierung ist (149, 150, 151).

3.7. Untersuchungen des Peptidanteils.

3.7.1. Aminosäurenanalysator.

Als nächste Aufgabe galt es, die vorkommenden Aminosäuren zu bestimmen. Dies geschah mit Hilfe eines Aminoanalysators. Die Proben wurden zu einem Teil auf einem Technicon-Autoanalyser im Lehrstuhl für Botanik der Ruhruniversität Bochum untersucht, in den mich freundlicherweise Herr Minuth einwies, zum anderen wurden sie im Lehrstuhl für Biochemie durch Herrn Dr. Kiltz auf einem Biocal-Gerät analysiert. Dabei wurde ein Programm verwendet, das eine Trennung der Hexosamine ermöglichte. Die Einzelergebnisse der Untersuchungen sind umseitiger Tabelle zu entnehmen.

3.7.1.1. Ergebnisse.

Diese isolierten und gereinigten Glycopeptide enthielten nur Threonin, Serin, Prolin, Glycin und Alanin. Außer diesen fanden sich noch kleine Mengen von Asparagin, Glutamin und Valin. Die Molrelationen betrugen beim Hauptprodukt ("C-31"):

(Thr)_{1,4} (Ser)_{1,3} (Pro)_{0,9} (Gly)_{1,9} (Ala)_{1,3}
(Asp)_{0,1} (Glu)_{0,3} (Val)_{0,3}

Nach elektrophoretischer Reinigung ("HVE-31"):

(Thr)_{1,0} (Ser)_{1,0} (Pro)_{0,7} (Gly)_{1,5} (Ala)_{0,9}
(Asp)_{0,1} (Glu)_{0,3} (Val)_{0,2}

Bei dem zweiten isolierten glycopeptid ("C-32"):

(Thr)_{1,4} (Ser)_{1,2} (Pro)_{1,1} (Gly)_{1,9} (Ala)_{1,3}
(Asp)_{0,2} (Glu)_{0,4} (Val)_{0,3}

Die Relation von Galactosamin zu (Threonin + Serin) beträgt:

bei ESM	: 1,7	bei C-32	: 1,3
bei C-31	: 1,3	bei HVE-31	: 1,0

Aminosäuren in mMol / g Glycopeptid

	ESM ¹⁾	C-1	C-2	C-3	C-31	C-32	C-311	HVE-31
Asp	0,18	0,37	0,29	0,10	0,02	0,06	0,01	0,02
Thr	0,22	0,25	0,26	0,07	0,28	0,37	0,29	0,18
Ser	0,23	0,30	0,26	0,24	0,26	0,32	0,25	0,18
Glu	0,23	0,42	0,52	0,14	0,07	0,10	0,07	0,06
Pro	0,27	0,26	0,26	0,20	0,19	0,29	0,25	0,13
Gly	0,32	0,37	0,38	0,38	0,39	0,52	0,41	0,27
Ala	0,23	0,20	0,24	0,23	0,24	0,33	0,25	0,16
Val	0,13	0,26	0,19	0,07	0,07	0,09	0,07	0,04
Ile	0,05	0,16	0,09	0,02	----	----	----	----
Leu	0,13	0,25	0,15	0,02	----	----	----	----
Tyr	0,04	0,07	0,04	0,03	----	----	----	----
GlcN	0,43	0,13	0,19	0,23	0,35	0,48	0,22	0,32
GalN	0,27	0,13	0,22	0,37	0,41	0,52	0,40	0,36
Phe	0,05	0,11	0,05	----	----	----	----	----

1) nach Diss. Huser

Erläuterung zur umseitigen Tabelle :

Alle Werte sind auf einem Aminosäureanalysator der Firma Biocal gewonnen.

Die Glycopeptide C-1 bis C-3 sind das Ergebnis unterschiedlich starker enzymatischer Abbau-stufen und unterscheiden sich in der Molekül-größe.

C-3 ließ sich in C-31 und C-32 auftrennen. Das Hauptprodukt wurde noch in präp. Hochspannungselektrophorese nachgereinigt : " HVE-31 ". C-311 ist C-31 noch einmal über DEAE-Cellulose nachgereinigt.

Die Aminosäurenwerte sind unkorrigiert.

3.7.2. Untersuchungen zur Aminosäuresequenz.

Da das Glycopeptid nur wenige Aminosäuren enthielt, wurde versucht, Hinweise auf die Sequenz zu erhalten.

Deshalb wurde das reinste Glycopeptid ("HVE-31") mit Aminopeptidase M und Carboxypeptidase A behandelt. Die in verschiedenen Zeitabschnitten gebildeten Produkte wurden auf Kieselgelplatten und im Aminosäurenanalysator untersucht.

3.7.2.1. Die Aminopeptidase M (vgl. 153).

Die Aminopeptidase M wurde von PFLEIDERER (154, 155, 156) et al. isoliert und untersucht. Aufgrund ihrer großen Aktivität ist sie als Exopeptidase für Sequenzuntersuchungen vom Aminoende her besonders gut geeignet.

Folgende Versuchsbedingungen wurden gewählt:

Etwa 0,1 mMol Peptid wurden in 0,1 M Morpholinacetatpuffer (pH = 7,5) gelöst (Vol.: 0,1 ml).

Etwa 50 bis 100 ml einer 0,1 %-igen Enzymlösung wurden zugegeben. Die Reaktionslösung wurde bei 37° C 1/2 Stunde bis 24 Stunden belassen.

Aus den Ergebnissen läßt sich schließen, daß sich das Glycopeptid durch Aminopeptidase M nicht angreifen läßt, was durch Dünnschicht und Aminoacidanalyser verifiziert wurde.

3.7.2.2. Carboxypeptidase A (CPA) (vgl. 157, 158).

Von der wie in 2 beschrieben angesetzten Enzymlösung wurden 10 mg in die Probe gegeben, die in einer Konzentration von 0,001 Mol/l in 0,1 Morpholinacetat (pH = 8,5) gelöst war.

Die Reaktionslösung wurde bei 37° C insgesamt 1 bis 24 Stunden belassen.

Auch dieses Enzym konnte das Glycopeptid nicht angreifen. Auch Erhöhung der Enzymkonzentration brachte da keine Änderung.

3.7.2.3. Endgruppenanalyse.

Wie schon beschrieben, konnte auch bei Dansylierung und Hydrazinolyse keine einzelne Aminosäure in ausreichender Menge freigesetzt werden.

Als Hauptprodukte wurden jeweils Stoffe gefunden, bei denen sich wahrscheinlich um zuckerhaltige Bruchstücke handelt. Das spricht dafür, daß an beiden Enden die Kohlenhydratseitenkette einen weiteren enzymatischen Abbau verhindert.

3.8. Untersuchung des Kohlenhydrat-Protein-Bindungstyp.

3.8.1. β -Elimination.

Das Hauptglycopeptid ("C-31") wurde einer β -Elimination unterworfen. Sie wurde bei Raumtemperatur in 0,5 N NaOH und einer Ausgangskonzentration von etwa 0,5 mg/l an Glycopeptid (vergl. 179).

Nach einer Stunde waren 32 % Threonin und 24 % Serin in Dehydrobuttersäure und Dehydroalanin umgewandelt. Nach 3 1/2 Stunden waren es 63 % bzw. 58 %.

Diese Werte wurde photometrisch in einem Zeiss-gerät bei 231 nm und bei 241 nm bestimmt.

Daher ist anzunehmen, daß der Kohlenhydratanteil O-glycosidisch an Serin und Threonin gebunden ist.

Die anschließende GLC - Untersuchung zeigte, daß Galactosamin weitgehend in das Alditol umgewandelt war.

Die Bindungsstelle ist also NAcGalN --- (Ser, Thr).

4. Diskussion.

4.1. Aufarbeitung des Mucins.

Es werden nach den von GOTTSCHALK et al. (162) beschriebenen Verfahren Versuche durchgeführt, um das Glycoprotein aus den wässrigen Extrakten von Pferdesubmaxillarisdrüsen zu isolieren.

Die Rohextrakte enthalten 4,63 % Zucker (kolorimetrisch). Durch Behandlung mit einem Gemisch aus Chloroform, Äther und Methanol (1 : 1 : 1) lassen sich 75 % des Materials extrahieren.

Es handelt sich dabei wahrscheinlich um zuckerhaltige Lipide wie etwa Ganglioside.

Nach Ausfällung mit Essigsäure enthält das Material nur noch 14,5 % "Lipide".

Da auch mit anderen Verfahren einheitliches Material in ausreichenden Mengen nicht produziert wird, und sich Glycopeptide leichter reinigen lassen, wird das Problem der Reinheit und Einheitlichkeit erst auf der Stufe der Glycopeptide behandelt. Das noch Fremdproteine und höchstwahrscheinlich eine "minor"-Komponente enthaltene Glycoprotein wird mehreren enzymatischen Proteolysen unterworfen.

Das gespaltene Material wird über eine gelchromatische Säule gereinigt. Nur die Bialpositive Fraktion wird gesammelt.

Aus diese Weise wird sichergestellt, daß Aminosäuren und nicht zuckerhaltige kleine Peptide entfernt sind.

Parallel dazu wurden in den Fraktionen noch die Neutralzucker bestimmt. Deren Gehalt verläuft praktisch parallel zum Gehalt an Neuraminsäure.

Man kann deshalb annehmen, daß die vermuteten Seitenketten der Glycopeptide sowohl Neutralzucker wie Neuraminsäure gemeinsam enthalten.

Wurde das Glycoprotein hingegen nicht durch Säurefällung gereinigt, sind noch weitere Zucker enthaltende Fraktionen nachzuweisen; diese enthalten außerdem noch Mannose, wie in Vorversuchen nachgewiesen wurde.

4.2. Enzymatische Spaltung.

Als Spaltungsenzym bewährte sich Pronase, deren Wirkung durch Wiederholung der Reaktion verstärkt wird. Wurde mit Ficin vorbehandelt, so waren zwei Behandlungen ausreichend.

Ficin besitzt zwar nicht die Wirkung von Pronase, wurde aber zum Vorspalten benutzt, um das teure Pronase zu sparen.

Das entstandene Produkt ist noch so groß, daß es in der Hochspannungselektrophorese nicht wandert. Der Gehalt an Kohlenhydrate ist gegenüber dem Ausgangsmaterial um den Faktor 6,5 angereichert, ebenso in Bezug auf Neuraminsäure.

Ficin greift also in erster Linie die mitgeschleppten Proteine und Peptide an, erst in zweiter Linie das durch die Neuraminsäure geschützte Mucin.

Auf diese Weise wird eine zusätzliche Reinigung erreicht, da sich die kurzen Peptide leicht im Molekularsieb abtrennen lassen.

4.3. Reinigung der Spaltprodukte.

Das Produkt der zweifachen Pronasebehandlung taucht im Ausschlußvolumen bei Verwendung von

Sephadex G-25 auf, bei Verwendung von Sephadex G-50 im doppelten Ausschlußvolumen in einem einheitlichen Peak auf.

Dieses in der Größe offensichtlich einheitliche Produkt kann durch Ionenaustauschchromatographie unter Anlegung eines Konzentrationsgradienten (Phosphatpuffer) in zwei Komponenten zerlegt werden. Die größere (85,6 %) taucht praktisch im Ausschlußvolumen auf, wird also nicht gebunden. Die zweite kleinere Komponente (14,4 %) erscheint bei einer Konzentration von 0,05 Mol/l.

4.4. Reinheitskriterien.

Diese Produkte (C-31 und C-32) werden verschiedenen Reinheitskriterien unterworfen.

In der Elektrophorese (HVE) wird bei verschiedenen pH-Werten nachgewiesen, daß sie keine freien Aminosäuren enthalten (Referenzsubstanzen: Asparaginsäure, Leucin und Arginin).

Auch freie Zucker (Aminosucker) können nicht nachgewiesen werden.

Da die untersuchten Glycopeptide in der Hochspannungselektrophorese noch leichte Verunreinigungen aufweisen, wird das Hauptprodukt C-31 einer präparativen Hochspannungselektrophorese unterworfen.

Das isolierte Glycopeptid ist so klein, daß es in seinem Wanderungsverhalten nicht von reiner Neuraminsäure unterscheidet.

Zur Kontrolle des Peptidanteils wurde HVE-31 einer Endgruppenbestimmung unterworfen.

Sowohl Dansylierung wie Hydrazinolyse wiesen als Hauptprodukte nicht weiter zu identifizierende Substanzen auf, bei denen es sich vermutlich um zuckerhaltige Stoffe handelt.

Das würde sich so erklären lassen, daß dieses Glycopeptid an seinen Enden die Zuckerseitenkette trägt, oder nicht mit dieser Methode zu untersuchen ist. Für letzteres sprechen ähnliche, in der Literatur beschriebene Ergebnisse (163). Außerdem spricht dafür, daß bei der im Aminoanalysator quantitativ ausgewerteten Hydrazinolyse viel zu wenig an Aminosäuren gefunden wurde.

Es wäre ein realistischer Wert für Proteine in der Größenordnung von 80 bis 100 Aminosäuren, das untersuchte Glycopeptid hat aber sicher weniger als höchstens zwanzig bis dreißig Aminosäuren.

In die gleiche Richtung würden die Ergebnisse deuten, die sich aus den Versuchen mit Aminopeptidase M und Carboxypeptidase ergeben: Beide Enzyme sind nicht in der Lage, Aminosäuren abzuspalten, obwohl speziell die Aminopeptidase M auch sperrigste Aminosäurenderivate abgespaltet.

Diese Ergebnisse ergaben sich aus dem Aminoacid-analyzer und Untersuchung mit Dünnschichtchromatographie.

Die Hauptschuld für diese Vorgänge trägt wohl auf Grund ihrer negativen Ladung die Neuraminsäure.

Da Fucose und Neuraminsäure immer endständig stehen, muß mindestens ein Verzweigung noch in der Seitenkette vorliegen, die durch ihre Sperrigkeit einen chemischen Angriff auf die Peptidkette behindert.

Von einer Entfernung der Neuraminsäure wurde abgesehen, da eine Vorbehandlung mit Hydroxylamin zur Abspaltung von O-Acyl-Gruppen notwendig ist um die Neuraminidase wirksam werden zu lassen.

Dabei wird nämlich zum Teil β -Elimination durch den hohen pH-Wert verursacht.

Bei einem Test wurde aus dem Glycoprotein Neuraminsäure durch Neuraminidase (RDE) abgespalten. Eine Analyse ergab, daß etwa 70 - 75 % der Neuraminsäure entfernt wurde.

Eine Neuraminsäureabspaltung würde nur die sowie so schon störende Mikroheterogenität nur künstlich erhöhen.

Eine Abspaltung mit Säure würde auch andere Bindungen erfassen - insbesondere Fucose - und verbietet sich so von selbst.

Die oben beschriebenen Beobachtungen lassen sich am besten durch die Annahme erklären, daß die Neuraminsäure sehr dicht am roteingerüst sitzt. Mit diesen Untersuchungen ist abgeklärt, daß die zu analysierenden Substanzen für die folgenden Bestimmungen hinreichend rein und einheitlich sind.

4.5. Diskussion der analytischen Methoden.

Die folgenden Untersuchungen werden durch folgende Tatsachen erschwert und zum Teil sogar verhindert:

- a. Gegenseitige Beeinflussung von Kohlenhydrat- und Peptidanteil,
- b. Alkalilabilität der Bindung GalN - (Ser,Thr),
- c. Unterschiedliche Stabilität der glycosidischen Bindungen.

So wurde durch die Alkalilabilität vor allem die Massenspektrometrie verhindert, da zur Alkoxidbildung extrem basische Bedingungen notwendig sind.

Bei den gaschromatographischen Analysen wurde der Einfluß der Unterschiede in der Säurestabilität der Zucker und ihrer Bindung untereinander durch

die Benutzung möglichst milder Bedingungen weitgehend unterdrückt.

Ein großes Problem ist die Interaktion zwischen Zucker und Aminosäuren.

In der Literatur werden Verluste bei den Aminosäuren von 9 - 31 % angegeben (164). Bei Verwendung einer großen Verdünnung (0,1 - 0,01 %-ig) reduziert sich dieser Wert auf unter 3 % Verlust (165).

Da die Proben unter Vakuum eingeschmolzen wurden, dürfte der Verlust diesen Wert nicht überschreiten.

Da bei der Gaschromatographie sich die einzelnen Peaks von Glycosamin und Galactosamin zu einem kleinen Teil überlappen, also die Werte zusammen etwas zu niedrig sind (ca. 15 %), wurden sie zusätzlich im Aminoacidanalyser bestimmt.

4.6. Besonderheiten der Aminosäurezusammensetzung.

Wie alle Mucine und Blutgruppensubstanzen besteht auch Pferdesubmaxillarmucin überwiegend aus nur wenigen Substanzen. Es handelt sich hierbei um Serin, Threonin, Prolin, Glycin und Alanin.

Tabelle (Mol pro 100 Mol AS):

	Thr	Ser	Pro	Gly	Ala	Summe
ESM (159)	10,6	11,1	13,0	14,4	11,1	60,2 %
C-1	7,8	9,3	8,1	11,5	9,5	46,2 %
C-2	9,5	9,5	9,5	13,9	8,8	51,2 %
C-3	15,9	14,1	11,8	22,4	13,5	77,6 %
C-31	17,8	17,1	12,1	25,7	15,8	88,5 %
C-32	17,7	15,8	12,5	25,4	17,8	89,2 %
HVE-31	16,5	16,5	11,9	24,8	14,7	84,4 %
C-311	18,1	15,6	15,6	25,6	15,6	90,5 %

Sehr interessant ist es, daß das Verhältnis dieser Aminosäuren zueinander annähernd konstant bleibt.

Unter der Voraussetzung, daß jede Seitenkette 1 Mol Galactosamin enthält, kommen auf ca. vier Aminosäuren eine Seitenkette bei C-31 und C-32. Bei HVE-31 sind es drei Aminosäuren pro Seitenkette. HUSER (160) gibt für sein ESM das Verhältnis 1 : 8 an. Die anderen Mucine liegen ebenfalls in diesem Bereich (161).

Auffällig ist die Konstanz der Aminosäurezusammensetzung bei den verschiedenen Abbaustufen.

Diese Beobachtungen machten schon andere Autoren (166). Um dies zu erklären, wurden - wie schon berichtet - Hypothesen aufgestellt.

PIGMAN gibt ein Rindersubmaxillarisglycopeptid folgender Zusammensetzung an:

Ser_{5,4}, Thr_{3,9}, Gly_{4,9}, Ala_{3,4}, Pro_{3,0}, Glu_{1,8},
Asp_{0,7}, Val_{1,9}, Leu_{1,1}, Ile_{0,5}, Arg_{1,1}.

Setzt man Pro = 3, erhält man für das hochgereinigte Pferdesubmaxillarisglycopeptid ("HVE-31"):

Ser_{4,0}, Thr_{4,0}, Gly_{6,0}, Ala_{3,6}, Pro_{3,0}, Glu_{1,2},
Asp_{0,4}, Val_{0,8}.

Die Ähnlichkeit zwischen diesem aus Pferden und dem aus Rindern isolierten Glycoproteinabbauprodukten ist frappant.

4.7. Überlegungen zur Biosynthese und Evolution der Submaxillarmucine.

Solche Beobachtungen zwingen zu der Annahme von periodischen Einheiten in der Eiweißkette.

PIGMAN et al. postulieren - wie schon beschrieben - zur Erklärung einen Zwei-Stufen-Mechanismus (167).

Die Ribosomen bilden Peptide von 20 bis 28 Aminosäuren Länge. Diese werden von Peptidpolymerasen zu den Proteinketten zusammengestrickt.

Diese Theorie hat den Vorteil, daß sie die Mikroheterogenität der Glycoproteine sehr gut erklärt, der Nachteil ist, daß in Zellen bisher kein derartiges Enzymsystem gefunden wurde.

Außerhalb von Zellen entspräche diese Theorie der Bildung von Fibrin aus Fibrogen.

Mir erscheint es zu aufwendig, für Glycoproteine einen besonderen Synthesemechanismus anzunehmen.

Genaugogut läßt sich meiner Meinung nach die Periodizität aus der Annahme der wiederholten Genverdopplung erklären.

Diese wird ja auch bei der Entstehung von Hämoglobin aus Myoglobin angenommen.

Dementsprechend kann man annehmen, daß aus einem Uryglycopeptid durch Genverdopplung beim crossing over die ganze Familie der einzelnen Glycoproteine entstanden ist.

Im Laufe der Jahrmillionen differenzierten sich die entstandenen Moleküle durch Punktmutationen in der DNS, bleiben aber trotzdem strukturell ähnlich.

Im Schnitt findet etwa eine Mutation auf 1.000 Gene in einer Generation statt (168).

Diese Mutationen betreffen im allgemeinen nur "funktionslose" Bezirke im Sinne der neutralen Mutation (169, 170), da funktionswichtige Bereiche durch Mutationen beeinträchtigt würden und durch den Evolutionssdruck eliminiert würden.

Auf diese Weise würde dann die eigenartige Struktur der Glycoproteine entstehen, mit periodischen "Kernstücken" und bunt zusammengewürfelten Verbindungsstrecken.

Von ähnlichen Periodizitäten wurde auch bei Kollagen, Protamin (Fisch), tierischer Wolle, Seidenfibroin berichtet (171). Auch menschliches und Rinderalbumin sollen Perioden haben (172). Teilweise wurden diese Wiederholungen durch Verwendung von statistischer Computerauswertung entdeckt (173, 174).

In diesem Zusammenhang möchte ich noch auf die Tatsache verweisen, daß sich die Codons der eine Zuckerbindung ausbildenden Aminosäuren nur minimal unterscheiden:

Asn	AAU (C)
Ser	AGU (C)
Thr	ACU (C,A,G)
Lys	AAA (G)

JETT und JAMIESON (175) folgern daraus, daß aus Asn als ursprünglichsten Bindungstyp durch eine einfache Punktmutation in die anderen Bindungstypen mutierte. Für die Entstehung eines Gln (CAA) - Bindungstyps wären hingegen zwei Mutationen notwendig.

4.8. Struktur der isolierten Glycopeptide.

In Übereinstimmung mit dieser Theorie kann man also annehmen, daß die Proteasen zuerst das "Füllsel" angriffen und den "harten Kern" des Glycoproteins kaum anknacken konnten.

Der harte Kern des Pferdesubmaxillarmucins hätte also in Analogie zu den Ergebnissen der Trypsinspaltung von BSM durch PIGMAN (176). Etwa 20 Aminosäuren folgender Zusammensetzung:

Thr₄, Ser₄, Gly₆, Pro₃, Ala_{3,6}, Glu_{1,2}, Asp_{0,4}, Val_{0,8}.

Die krummen Zahlen dürften auf Variationen durch Punktmutationen entstanden sein.

Dieses Glycopeptid trägt auch Kohlenhydratseitenketten mit der Zusammensetzung im Fall von C-31:



im Fall des Glycopeptids C-32:

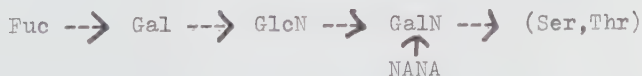


Die Seitenketten sitzen also sehr dicht aufeinander und es würde sowohl die starke Pufferwirkung wie die Widerstandskraft gegen Proteasen erklären. Außerdem würde es erklären, wieso nach alkalischer Borhydridreduktion die Seitenketten plötzlich dialyseschlauchdurchgängig sind.

Die Annahme von größeren kohlenhydratfreien Strecken mit vermutlicher Helixstruktur deckt sich mit der Beobachtung, daß Glycoprotein durch Alkohol und Detergentien denaturiert wird (176).

Das Vorkommen von zwei sich unterscheidenden Seitenkettentypen spricht dafür, daß es eine minor und eine major - Komponente wie bei anderen Submaxillarmucinen gibt.

Für die Hauptkomponente C-31 ist folgende Struktur am wahrscheinlichsten:



Vermutlich wurde ein Teil der Fucose durch die Aufarbeitung - insbesondere durch die Säurefällung -

zerstört worden. Außerdem dürfte Fucose als äußerster Zucker sowieso Einbauausfälle haben.

Die Nebenkomponente C-32 unterscheidet sich davon durch eine zusätzliche Galactose, die vermutlich an der Galactose als Verzweigung sitzt.

Diese These deckt sich mit den Ergebnissen der HUSER'schen Hydrolyseversuche (177).

Es wäre theoretisch allerdings denkbar, daß es sich bei den beiden gefundenen Komponenten um Abbauprodukte ein und desselben Stoffes handelt. Wäre dies so, wäre ein kontinuierlicher Übergang zu erwarten, im Gegensatz zu den gefundenen scharf getrennten Peaks.

5. Zusammenfassung der Arbeit.

Aus Pferdesubmaxillarismucin konnten durch enzymatischen Abbau zwei Glycopeptide gewonnen und isoliert werden.

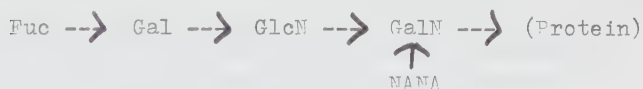
Diese Glycopeptide sind frei von mitgeschleppten Aminosäuren und Zuckern.

Sie sind einheitlich und rein in der Ionenaustausch- und Gelchromatographie und in der Hochspannungselektrophorese.

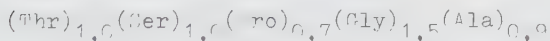
Sie können durch Aminopeptidase und Carboxypeptidase nicht weiter abgebaut werden.

Der Aminosäurenanteil wird im Aminoacidanalyser untersucht, der Kohlenhydratanteil gaschromatographisch. Die Analysendaten sind den Tabellen zu entnehmen.

Die Struktur des Hauptproduktes C-31 ist vermutlich:



Der Proteinanteil entspricht der Formel:



Beide isolierten Glycopeptide unterscheiden sich im Peptidanteil praktisch nicht.

Zuckerseitenkette und Peptid sind durch eine alkalilabile Bindung zwischen Galactosamin und Serin bzw. Threonin verknüpft.

Es wird eine Hypothese zur Biosynthese und Evolution der Mucine aufgestellt und begründet.

L I T E R A T U R L I S T E

1. J. Bostock J. Nat. Phil. Chem. Arts 2nd Ser 11
(1806) 140.
2. E. Eichwald Ann. Chem. Pharm., 134 (1865) 177
3. O. Hammarsten Z. Physiol. Chem., 12 (1888) 163
4. O. Hammarsten Arch. Ges. Physiol. 36 (1885) 373
5. O. Hammarsten Lehrbuch der Physiol. Chemie 3. Aufl.
Wiesbaden (1895) S. 39
6. O. Hammarsten Z. Physiol. Chem. 15 (1891) 202
7. K. Meyer Cold Spring Harbor Symposia on quanti-
tative Biology, 6 (1938) 96
8. A. Gottschalk Perspectives Biol. Med. 5 (1962) 327
9. R.A. Gibbons in Glycoproteins, hrsg. v. Gottschalk, Amster-
dam, (1966) Ch. 3
10. S. Roseman Biochem. of Glycoproteins and related
substances Part II p. 244, Basel (1968)
11. A. Gottschalk & E. Buddecke in: Glycoproteins hsg. A. Gott-
schalk 2nd Ed, Amsterdam (1972) p. 531
12. H. Faillard R. Schauer ibid. p. 1246
13. R. Schauer Ang. Chem. 85 (1973) 136
14. A.L. De Vries & D.A. Wohlschlag, Science 163 (1969) 1073
15. A.L. De Vries & S.K. Komatsu & R.E. Feeney J. Biol. Chem.
245 (1970) 2901
16. L. Demling Der kranke Magen, München 1970
17. C. Velican, N. Marcus & S. Tacorian & Am. Digest Diseases
15 (1970) 413
18. E. Buddecke Lehrbuch der Physiologische Chemie
19. A. Gottschalk Glycoproteins Amsterdam (1972)
20. A.G. Morrell & G. Gregoriadis & J.H. Scheinberg & J. Hickman &
G. Ashwell J. Biol. Chem. 246 (1971)
21. B.C. Goverde & F.J.N. Veenkamp & J.D.H. Homan Acta Endocrinol
59 (1968) 105
22. A. Gottschalk & W.K. Whitters & E.R.G. Graham BBA 38 (1960) 183
23. M. Sulfait & L.E. Reichert Jr. & R.J. Winzler J. Biol. Chem.
246 (1971) 3405
24. G.D. Braunstein & L.E. Reichert Jr. & E.V. van Hall, J.L.
Vaitukaitis & G.T. Ross Biochem. Biophys. Res. Comm. 42 (1971)
962
25. J. Labat & B. Lebel & G. Parrot & J.E. Courtois Compt. Rend.
263 (1966) 2050

26. B.S. Blumberg & L. Warren BBA 50 (1961) 90
27. T.G. Muldoon & U. Westphal J. Biol. Chem. 242 (1967) 5636
28. W. Pigman & D. Horton "The Carbohydrates" Ch. 43 N.Y. (1970)
29. ibid.
30. ibid.
31. A.L. de Vries & D.A. Wohlschlag Science 163 (1969) 1073
32. A. Gottschalk in "Glycoproteins" Amsterdam (1972)
p. 141
33. L.C. Maillard Compt. Rend. 154 (1912) 66
34. L.C. Maillard Compt. Rend. 155 (1912) 1554
35. L.C. Maillard Ann. Chim. (Paris)/11/5 (1916) 258
36. L.C. Maillard Ann. Chim. (Paris)/11/7 (1917) 113
37. A. Gottschalk in "Glycoproteins" Amsterdam (1972)
p. 143
38. H.S. Isbell & H.L. Frush J. Org. Chem. 23 (1958) 1309
39. ibid
40. R. Montgomery in "The Carbohydrates" IIB 2nd ed. Hsg.
W. Pigman & D. Horton, New York (;970) p. 640
41. A. Neuberger & A. Gottschalk & R.D. Marshall & R.G. Spiro
in "Glycoproteins" ed. A. Gottschalk
Amsterdam (;972) p. 452
42. G.S. Marks & R.D. Marshall & A. Neuberger
in Biochem. J. 87 (1963) 265, 274
43. E.D. Kaverzneva & V.P. Bogdanov
Biochem (USSR) 27 (1962) 233
44. I. Yamashina & M. Makino
J. Biochem (Tokyo) 51 (1962) 359
45. R.D. Marshall & A. Neuberger
Biochemistry 3 (1964) 1596
46. C.H. Bolton & R.W. Jeanloz
J. Org. Chem. 28 (1963) 3228
47. A. Yamamoto & C. Miyashita & H. Tsukamoto
Chem. Pharm. Bull. Tokyo 13 (1965) 1041
48. R. Montgomery in "The Carbohydrates" IIB 2nd ed. Hrsq.
W. Pigman & D. Horton New York (1970) 640
49. A. Tsugita & S. Akabori J. Biochem. 46 (1959) 695
50. K. Tanaka & W. Pigman J. Biol. Chem. 240 (1965) 1487

51. D.T.A. Lamport in Nature 216 (1967) 1322
52. W.T. Butler & L.W. Cunningham
J. Biol. Chem. 240 (1965) 1487
53. R.G. Spiro J. Biol. Chem. 242 (1967) 4813
54. A. Gottschalk & E.R.B. Graham
BBA 34 (1959) 380
55. G. Blix & E. Lindberg & L. Odin & I. Werner
Acta Soc. Med. U Upsalien 61 (1956) 1
56. R. Schauer & H. Faillard
Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 961
57. R. Schauer Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 595
58. M. Bertolini & W. Pigman
Carbohydrate Res. 14 (1970) 53
59. T. Ozeki & Z. Yosizawa Arch. Biochem. Biophys. 142 (1971) 177
60. R.L. Katzman & E.H. Eylar
Arch. Biochem. Biophys. 117 (1966) 623
61. M. de Saiegui & H. Plonska
Arch. Biochem. Biophys. 129 (1969) 49
62. R.L. Katzman & E.H. Eylar
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23 (1966) 769
63. D.M. Carlson J. Biol. Chem. 241 (1966) 2984
64. D.M. Carlson J. Biol. Chem. 243 (1968) 616
65. ibid
66. A. Gottschalk & W.H. Murphy & E.R.B. Graham
Nature 194 (1962) 1051
67. A. Gottschalk & W. König
BBA 158 (1968) 358
68. A. Gottschalk & H. Schauer & G. Uhlenbruck
Z. Physiol. Chem. 352 (1971) 117
69. G. Tettamanti & W. Pigman
Arch. Biochem. Biophys. 124 (1968) 41
70. E.R.B. Graham & A. Gottschalk
BBA 38 (1960) 513
71. V.L.N. Murty & M.I. Horowitz
in "Carbohydrate Res." 6 (1968) 266
72. E. Buddecke & H. Schauer & E. Werries & A. Gottschalk
Biochem. Biophys. Res. Commun. 34 (1969) 517

73. R. Montgomery in "The Carbohydrates" IIb 2nd ed. hrsg.
W. Pigman & D. Horton New York (1970) p.
74. E. Sarcione J. Biol. Chem. 239 (1964) 1686
75. W.R. Petersen & C.P. Leblond
J. Cell. Biol. 21 (1964) 143
76. S. Roseman "Biochem. of Glycoproteins and related
substances Part II p. 244 Basel (1968)
77. W. Pigman & D. Horton The Carbohydrates IIa Ch 34 New York (1970)
78. J. Huser Diss. Bochum (1971)
79. W. Pigman & N. Payza & J. Moschera & M. Weiss
Federation Proc. 29 (1970) 599
80. F. Downs & W. Pigman Biochemistry 8 (1969) 1760
81. W. Pigman & M. Weiss Eur. Biochem. J. 32 (1973) 148
82. ibid
83. W. Pigman & F. Downs & J. Moschera & M. Weiss
Proc. Int. Conf. Blood Tissue Antigens
Academic Press New York (1970)
84. J. Moschera & R. Mound & N. Payza & W. Pigman & M. Weiss
FEBS Lett. 6 (1970) 326
85. G. Tettamanti & W. Pigman
Arch. Biochem. Biophys 124 (1968) 41
86. T. Tsuiki & Y. Hashimoto & W. Pigman
J. Biol. Chem. 262 (1961) 2172
87. Ö. Levin Methods of Enzymology Vol. 5 p. 27
88. J. Huser Diss. Bochum (1971)
89. S.P. Colowick & N.O. Kaplan
Methods of Enzymology New York (1966)
Vol. XIX
90. ibid p. 261
91. L. Svennerholm BBA 24 (1957) bzw. Ark. Kemi 10 (1957) 577
92. M. Dubois & K. Gilles & J.K. Hamilton & P.A. Rebers & F. Smith
Analyt. Chem. 28 (1956) 350
93. W.A. Schroeder Methods of Enzymology Vol. XXV Ed.
S.P. Colowick & N.O. Kaplan New York (1972)
94. W.R. Gray ibid p. 121
95. V.N. Reinhold in "Methods in Enzymology" XXV B, hrsg
S.P. Colowick & N.O. Kaplan New York (1972)

96. J.R. Clamp & T. Bhatti & R.E. Chambers
in Glycoproteins hrsg. A. Gottschalk
Amsterdam (1972) p. 300
97. R.A. Laine & W.J. Esselman & C.C. Sweeley
in Methods of Enzymology, XXVIII B hrsg.
S.P. Colowick & N.O. Kaplan New York
(1972) p. 159
98. L.C. Maillard
Compt. Ren. 154 (1912) 66
154 (1912) 1554
99. V.N. Reinhold
in "Methods in Enzymology" XXX B ed.
S.P. Colowick & N.O. Kaplan New York (1972)
100. J. Huser
Diss. Bochum 1971
101. R. Schauer & Hoppe - Seylers
Z. Physiol. Chem. 351 (1970) 595
102. V.N. Reinhold
in "Methods in Enzymology" Vol. eds.
S.P. Colowick & N.O. Kaplan New York (1972)
103. T. Purdie & J.C. Irvine
J. Chem. Soc. 83 (1903) 1021
104. E.L. Hirst & E. Percival
Meth. Carb. Chem. 5 (1965) 287
105. R. Kuhn & H. Trischmann & I. Löw
Angew. Chem. 67 (1955) 32
- 106 Y.C. Lee & J.R. Scoocca J. Biol Chem. 247 (1972) 5753
107. H. Yamaguchi & T. Ikenaka & Y. Matsushima
J. Biochem. 70 (1971) 587
108. R. Kuhn & H.H. Baer & A. Seeliger
Ann 611 (1958) 236
109. R. Kuhn & H. Egge & R. Brossmer & A. Gauhe & P. Klesse & W. Lochin-
ger & E. Röhm & H. Trischmann & D. Tschampel
Angew. Chem. 72 (1960) 805
110. H. Björndahl & C.G. Hellerqvist & B. Lindberg & S. Svenson
Ang. Chem. 82 (1970) 643
111. K. Stella & H. Saito & S. Hakamori
Arch. Biochem. Biophys. 155 (1973) 464
- 112
"Glycoproteins" A. Gottschalk ed. Am-
sterdam (1972) p. 322
- 113 D.M. Carlson
J. Biol. Chem. 243 (1968) 616

114. M.E. Ethler & B. Anderson & S. Beychok & F. Gruezo & K.O. Lloyd
& N.G. Richardson & E.A. Kabat
Arch. Biochem. Biophys. 141 (70) 588
- 115 B. Anderson & E.A. Kabat & S. Beychok & F. Gruezo
Arch. Biochem. Biophys. 145 (1971) 490
116. L. Rovis & B. Anderson & E.A. Kabat & F. Gruezo & J. Liao
Biochem. 12 (1973) 5340
117. R. Kuhn & H. Egge Chem. Ber. 96 (1963) 3338
118. siehe 114.
119. E.P. Adams & G.M. Gray
Chem. Phys. Lip. 2 (1968) 147
120. R. Kuhn & H. Trischmann
Chem. Ber. 96 (1963) 284
121. siehe 110.
122. E.L. Hirst & E. Percival
Meth. Carb. Chem. 5 (1965) 287
123. W.N. Haworth J. Chem. Soc. 107 (1915) 8
124. S. Hakamori J. Biochem. 55 (1964) 205
- 125 E.J. Corey & M. Cheykovsky
JACS 84 (1962) 866
126. H.E. Conrad Meth. Carb. Chem. 6 (1972) 361
127. P.A. Sandford & H.E. Conrad
Biochem. 5 (1966) 1508
128. B. Lindberg Methods in Enzymology XXVIII B Colowick,
& Laplan (Eds) New York (1972) p. 178
129. R.D. Marshall & A. Neuberger
in "Glycoproteins" A. Gottschalk Ed.
Amsterdam (1972) p. 322
- 130 H.O. Bouvend & B. Lindberg
Adv. Carbohydr. Chem. 15 (1960) 53
131. H. Björndal & C.G. Hellerqvist & B. Lindberg & S.Svenson
Angew. Chem. 82 (1970) 643
132. B. Lindberg in "Methods in Enzymology" Colowick &
Kaplan Eds. Bd. XXVIII B, New York (1972) 178
133. H.O. Bouveng & B. Lindberg
Meth. Carbohydr. Chem. 5 (1965) 296
134. K. Stellner & H. Saito & S. Hakomori
Arch. Biochem. Biophys. 155 (1973) 464

135. W. Stoffel & P. Hanfland
Z. Physiol. Chem. 354 (1973) 21
136. K. Stellner & K. Watanabe & S. Hakomori
Biochem. 12 (1973) 656
137. J. Baenzinger & S. Kornfeld & S. Kochwa
J. Biol. Chem. 249 (1974) 1889,1897
138. S. Hakomori & S. Stellner & K. Watanabe
Biochem. Biophys. Res. Comm. 49 (1972) 1061
139. B.H. Freeman & A.M. Stephen & P. van der Bijl
J. Chromatogr. 73 (1972) 29
140. R. Toman & S. Karacsonyi & V. Kovacik
Carbohydrate Res. 25 (1972) 371
141. D. Anderle & P. Kovacs
J. Chromatogr. 49 (1970) 419
142. G. Kubberod
A. Chem. Scand. 26 (1972) 2544
- 143 H. Björndal & C.G. Hellerqvist & B. Lindberg & S.Svenson
Ang. Chem. 82 (1970) 643
144. K. Stellner & H. Saito & S. Hakomori
Arch. Biochem. Biophys. 155 (1973) 464
145. G. Schwarzman & V. Reinhold & R.W. Jeanloz
C.N.R.S. Intern. Symp.
nach Organikum
146.
nach Organikum
147. R.G. Spiro
"Methods in Enzymology" S.P. Colowick &
N.O. Kaplan (Eds) New York (1972) Bd.
XXVII 3 p. 1
148. J.F. Kennedy & M.F. Chaplin
Biochem. J. 130 (1972) 417
149. L. Svennerholm & J.E. Mansson & Y.T. Li
J. Biol. Chem. 248 (1973) 740
150. P. Maury
BBA 152 (1968) 353
151. K.A. Karlsson
FEBS-Letters 32 (1973) 317
152.
Diss. Huser, Bochum (1971)
153. A. Light
Methods in Enzymology Vol. XXV B S.P.
Colowick & N.O. Kaplan (Eds) New York
(1972) p. 253

154. G. Pflleiderer ibid. Vol. XIX p. 514
155. G. Pflleiderer & P.G. Celliers
 Biochem. Z. 339 (1963) 186
156. E.D. Wachsmuth & I. Fritze & G. Pflleiderer
 Biochemistry 5 (1966) 169
 5 (1966) 175
157. R.P. Ambler
 in "Methods in Enzymology" Vol. XXV B
 S.P. Colowick & M.O. Kaplan (Eds.) New
 York (1972) p. 262
158. ibid. Vol. XIX p. 476
159. J. Huser Diss. Bochum (1971)
160. ibid.
161. A. Gottschalk in "Glycoproteins II" Amsterdam (1972)
162. A. Gottschalk Glycoproteins Amsterdam (1972) 2nd Ed.
163. Z. Yosizawa & T. Sato BBA 52 (1961) 591
164. A. Pusztai & W.T.J. Morgan
 Biochem. J. 80 (1961) 107
165. J.P. Dustin & C. Czaikowska & S. Moore & F.J. Bigwood
 Anal. Chim. Acta 9 (1953) 256
166. s. Einl.
167. Pigman & Ward Eur. J. Biochem. 32 (1973) 148
168. J.L. Vind FASEB-Tagung, Atlantic City (1975)
169. M. Kimura Nature 217 (1968) 624
170. J.L. King & T.H. Jukes
 Science 164 (1969) 788
171. M. Ycas FASEB-Tagung, Atlantic City (1975)
172. J.R. Brown ibid.
173. J.R. Brown ibid.
174. M. Ycas ibid.
175. M. Jett & G.A. Jamieson
 Carbohydr. Res. 18 (1971) 466
176. A. Gottschalk in "The Glycoproteins" Amsterdam (1972)
177. H. Huser Diss. Bochum (1971)

178. R.G. Spiro in : " Methods in Enzymology "
Bd. VIII, New York 1966, p.4
179. R. & A. Clotten, "Hochspannungselektrophorese "
Stuttgart 1962
180. Zahn (nach Reindel & Hoppe) ibid. p.149

Herrn Prof. Dr. Hans Faillard danke ich für die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. G. Pfeleiderer danke ich dafür, daß er mir in der schwierigen Situation nach dem Weggang von Prof. Dr. Faillard die Weiterführung und schließlich den Abschluß meiner Arbeit ermöglicht hat.

Für die gute Zusammenarbeit und manchen Hinweis möchte ich mich auch bei den folgenden Herren bedanken :

Prof.Dr. R. Schauer

Dr. Wiltz

Dr. Wirtz - Peitz

LEBENS LAUF

Ich, Bernd Herfort, wurde am 16. Mai 1948 als Sohn des dam. Gerichtsreferendars Dr. iur. Friedrich Herfort und seiner Ehefrau Erika geb. Pepperle zu Mörfelden im Kreis Groß - Gerau geboren.

1954 wurde ich in die dortige Volksschule eingeschult.

Nach dem Umzug meiner Eltern nach Frankfurt am Main besuchte ich die Zentgrafenschule im Stadtteil Seckbach. (1955 - 1958) .

Nach der Aufnahmeprüfung (1958) ging ich dann bis zu meinem Abitur am 2. Nov. 1966 auf das humanistische Heinrich-von-Gagern-Gymnasium in Frankfurt.

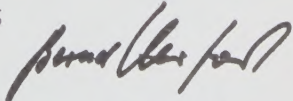
Ab Wintersemester 1966/67 studierte ich bis SS 1969 Chemie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt. Das Vordiplom bestand ich dort im April 1969 .

Ab WS 1969/70 setzte ich mein Chemiestudium an der Ruhruniversität Bochum fort. Nach der Diplomprüfung im Mai 1971 begann ich meine Diplomarbeit bei Prof. Dr. Kirmse im dortigen Lehrstuhl für Organische Chemie. über Reaktionen von Bicyclo (4.1.0)-Carboniumionen. Meine Arbeit beendete ich im Mai 1972.

Im Herbst 1972 begann ich im Lehrstuhl für Physiologische Chemie bei Prof. Dr. Faillard mit der vorliegenden Arbeit.

Da mein Berufsziel die Anerkennung als " Klinischer Chemiker " ist, studiere ich seit WS 1971/72 Medizin parallel und erwarb die dafür erforderlichen Scheine und Kenntnisse.

Bochum, im März 1976


(Bernd Herfort)

